

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 123**

51 Int. Cl.:

A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2016 PCT/CN2016/070032**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16110228**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2016 E 16734888 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3241852**

54 Título: **Polímero anfifílico basado en ácido hialurónico, método de preparación y su aplicación**

30 Prioridad:

07.01.2015 CN 201510006737

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2019

73 Titular/es:

BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
Building C25, No. 218 Xinghu Street, BioBAY Suzhou Industrial Park
Suzhou, Jiangsu 215123, CN

72 Inventor/es:

ZHONG, ZHIYUAN;
ZHONG, YINAN;
MENG, FENGHUA;
YUAN, JIANDONG;
HUANG, YANGQING y
CHI, JIANWEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 698 123 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polímero anfifílico basado en ácido hialurónico, método de preparación y su aplicación

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un material polimérico biodegradable y su aplicación y, en particular, a un polímero anfifílico basado en ácido hialurónico, nanopartículas preparadas a partir del mismo y su aplicación, que se refieren al campo de los materiales farmacéuticos.

Técnica relacionada

10 Los polímeros naturales anfóteros se pueden autoensamblar en agua usando una interacción intermolecular para formar nanopartículas de polímero que incluyen una capa hidrófila externa y una capa hidrófoba interna. Las nanopartículas que entran en un cuerpo humano como un vehículo para fármacos pueden reducir eficazmente la fagocitosis de macrófagos en el sistema reticuloendotelial humano (RES), pueden pasar a través del espacio celular, atravesar los conductos capilares más pequeños del cuerpo humano y la barrera hematoencefálica (H-Lys(Boc)-OMe) y ser absorbidas por el tejido celular. El vehículo para fármacos de nanopartículas puede regular la liberación del fármaco en un sitio diana, reducir la dosificación del fármaco, mejorar la eficacia del fármaco y reducir la toxicidad del fármaco. Las nanopartículas de polímeros anfifílicos ideales deben tener una buena estabilidad en la circulación sanguínea con el fin de evitar una liberación prematura de fármaco y una capacidad de liberar rápidamente el fármaco en las células tumorales.

15 Jian You encontró que el enriquecimiento de DOX en un sitio del tumor era menor que 5% ID/g después de 6 h y 24 h después de la inyección en una vena de la cola de nanoesferas de oro huecas con contenido de doxorubicina (DOX) cuya superficie fue modificada con polietilenglicol (PEG) (véase Jian You *et al.*, Photothermal-Chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release, Journal of Controlled Release 158 (2012) 319-328). La distribución de nanopartículas con contenido de fármaco polímeras existentes en tumores es generalmente de 1-5% ID/g, dando lugar a escasa biodisponibilidad del fármaco y efectos secundarios tóxicos. Con sus superficies modificadas con algunas moléculas de dirección a diana como polipéptidos, hidratos de carbono, anticuerpos y aptámeros, las nanopartículas con contenido de fármaco polímeras pueden entrar efectivamente en las células tumorales a través de endocitosis mediada por receptores y se puede mejorar grandemente el enriquecimiento de nanopartículas en el sitio del tumor. Sin embargo, esto aumenta el coste de la preparación y puede haber un efecto sobre el tamaño de las nanopartículas.

20 Al mismo tiempo, un vehículo para fármacos necesita adicionalmente propiedades como una buena biocompatibilidad, metabolitos inofensivos para el cuerpo humano y una amplia gama de fuentes, una diversidad de grupos funcionales en unidades repetidas, que sea fácil de modificar, de forma que tenga una gran capacidad potencial de aplicación en la liberación controlada de fármacos.

Sumario

Un objeto de la presente invención es proporcionar un polímero anfifílico basado en ácido hialurónico.

35 Con el fin realizar el objetivo anteriormente mencionado, una solución técnica específica proporcionada por la presente invención es:

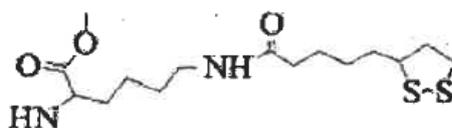
un polímero anfifílico basado en ácido hialurónico como se define en la reivindicación 1.

El ácido hialurónico tiene un peso molecular de 7 a 500 kDa; el grado de sustitución de la cadena lateral es de 5 a 40%.

40 En una realización de la presente invención, el ácido hialurónico (HA) tiene un peso molecular de preferentemente de 10 a 100 kDa. En otra realización de la presente invención, el ácido hialurónico tiene un peso molecular preferentemente de 9 a 37 kDa.

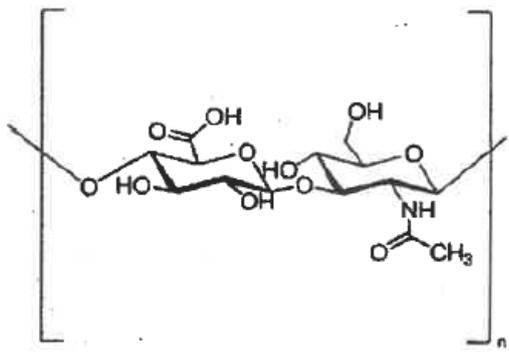
En una realización de la presente invención, el grado de sustitución de la cadena lateral es de 5 al 40%. En otra realización de la presente invención, el grado de sustitución de la cadena lateral es preferentemente de 10 a 28%.

45 La cadena lateral es éster metílico de lisina-lipoilo, cuya fórmula estructural es como sigue:



La expresión "ácido hialurónico (HA)" usada en la presente invención es un mucopolisacárido ácido, también conocido como ácido urónico, hialuronano, y su estructura básica es de polisacáridos grandes compuestos por dos

5 unidades de disacáridos: ácido D-glucurónico y N-acetil-glucosamina. El ácido hialurónico consiste en centenares, millares o incluso decenas de millares de unidades de disacáridos, en que el ácido D-glucurónico y la N-acetil-glucosamina están unidos mediante un enlace β -1,3-glicosídico y las unidades de disacáridos están unidas unas a otras mediante un enlace β -1,4-glicosídico. El peso molecular de una unidad de disacárido es 379,3 y, según el diferente número de unidades de disacáridos que componen el ácido hialurónico, el peso molecular del ácido hialurónico puede variar en el intervalo desde varios miles hasta decenas de miles de Daltones (kDa). La fórmula estructural de HA es como sigue:



10 Cada unidad repetida en esta fórmula estructural tiene un peso molecular de 379,3 y cada unidad repetida contiene un grupo carboxilo.

La expresión "alquilo alifático C₁-C₁₀" usada en la presente invención se refiere a un grupo alquilo alifático lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Ejemplos representativos de alquilo alifático C₁-C₁₀ incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, terc-pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo.

15 La expresión "grado de sustitución" usada en la presente invención se refiere al grado en que el grupo hidroxilo de -COOH en una molécula de HA está sustituido por la cadena lateral. Un método de cálculo del grado de sustitución (DS) es como sigue:

20 Se toman HA-Lys y sus espectros de ¹H RMN (400 MHz, D₂O) mostrados en la Fig. 10 como ejemplo y el grado de sustitución se puede calcular basado en una integral de área de los picos f y a. Por ejemplo, para HA-Lys con un DS del 20%, su área integral f/a es de aproximadamente 20%.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar el polímero anfifílico basado en ácido hialurónico descrito por la presente invención. El método comprende las siguientes etapas: en primer lugar, el ácido hialurónico es sometido a una reacción de amidación con un aminoácido protegido en N, un derivado o análogo del mismo, o una alquil-diamina C₃-C₁₁ y es convertido en un ácido hialurónico conectado al aminoácido protegido en N, un derivado o análogo del mismo o la alquil C₃-C₁₁-diamina a través de un enlace amido; seguidamente se lleva a cabo la desprotección y el producto desprotegido experimenta una reacción de amidación con anhídrido lipoico, para obtener el polímero anfifílico basado en ácido hialurónico anteriormente mencionado.

En una realización de la presente invención, el grupo protector de dicho aminoácido protegido en N, un derivado o análogo del mismo incluye, pero sin limitación, por ejemplo, Boc, Fmoc, Bpoc, Ddz, Cbz, Bn o Tos.

30 En una realización de la presente invención, la reacción de amidación entre el ácido hialurónico y el aminoácido protegido en N, un derivado o análogo del mismo, o una alquil C₃-C₁₁-diamina se lleva a cabo con la catálisis de un agente acoplante. Los agentes acoplantes adecuados incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (EDCI/HOBT), carbodiimida/1-hidroxi-7-azobenzotriazol (EDCI/HOAT), hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), hidrocloreto de 4-(4,6-dimetoxitriazino-2-il)-4-metilmorfolina (DMTMM), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tripirrolidinilo (PyBOP), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) o N-hidroxi-tiosuccidil-sulfonato de sodio.

40 En una realización de la presente invención, la reacción de amidación entre el producto desprotegido y anhídrido lipoico se lleva a cabo con la catálisis de un agente acoplante. Los agentes acoplantes adecuados incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP), diisopropiletamina (DIPEA), N-metilmorfolina, N,N-dimetilanilina, piridina y derivados de piridina sustituidos como 2,6-dimetilpiridina, 2,4,6-trimetilpiridina o 4-dimetilaminopiridina.

45 En una realización de la presente invención, el polímero anfifílico basado en ácido hialurónico en el que la cadena lateral es un grupo de éster metílico de lisina-lipoilo puede ser obtenido mediante dos etapas de una reacción de amidación: en primer lugar, bajo la catálisis de hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida/N-

hidroxisuccinimida (EDC/NHS), un ácido hialurónico (HA) reacciona con éster metílico de N-terc-butoxicarbonil-lisina (H-Lys(Boc)-OMe) a través de una reacción de amidación para obtener ácido hialurónico-éster metílico de N-terc-butoxicarbonil-lisina (HA-Lys(Boc)-OMe), seguido de desprotección, para obtener ácido hialurónico-éster metílico de lisina (HA-Lys-OMe); el HA-Lys-OMe reacciona con anhídrido de ácido lipoico (LAA) a través de una reacción de amidación bajo catálisis de 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP), para obtener un polímero anfifílico basado en ácido hialurónico HA-Lys-LA.

Se introduce un aminoácido, o derivado o análogo del mismo, o una alquil C₃-C₁₁-diamina covalentemente unida a un grupo lipoilo como un segmento hidrófobo en la cadena lateral de un ácido hialurónico polímero hidrófilo, para obtener un polímero anfifílico; el polímero anfifílico puede ser autoensamblado en una solución acuosa para formar nanopartículas y seguidamente se puede usar un agente reductor como ditioneitol (DTT) para reticular el grupo lipoilo y obtener nanopartículas reticuladas, que pueden aumentar la estabilidad de las nanopartículas. En este tratamiento, la solución acuosa se puede seleccionar entre agua pura, solución tamponada con fosfato (PBS) y solución tamponante de ácido 4-hidroxiethyl-piperazino-etanosulfónico (Hepes), etc.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es proporcionar nanopartículas reticuladas compuestas por el polímero anfifílico anteriormente mencionado, en las que la capa hidrófila externa está compuesta por ácido hialurónico y la capa hidrófoba interna está compuesta por anillos de cinco miembros reticulados de la cadena lateral.

En una realización de la presente invención, las nanopartículas reticuladas de la presente invención están compuestas por el polímero anfifílico anteriormente mencionado, en el que la capa hidrófila externa está compuesta por ácido hialurónico y la capa hidrófoba interna está compuesta por anillos cinco miembros reticulados del grupo éster metílico de lisina-lipoilo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar dichas nanopartículas reticuladas, que comprende las etapas de:

(1) formar nanopartículas mediante autoensamblado del polímero anfifílico, en que la capa externa hidrófila de las nanopartículas está compuesta por ácido hialurónico de dirección a diana activo y la capa hidrófoba interna está compuesta por grupos de las cadenas laterales (por ejemplo, grupo éster metílico de lisina-lipoilo);

(2) reticular la capa hidrófoba interna de las nanopartículas en la etapa (1), para estabilizar la estructura de las nanopartículas por reticulación de anillos de cinco miembros de grupos lipoilo, para obtener nanopartículas reticuladas.

En una realización de la presente invención, el polímero anfifílico en la etapa (1) anterior es autoensamblado en una solución acuosa para formar nanopartículas que tienen un grupo de cadena lateral (por ejemplo, éster metílico de lisina-lipoilo) como un resto hidrófobo y las nanopartículas tienen un diámetro de partícula de 50-300 nm. Este tamaño es estable y la distribución es uniforme.

En una realización de la presente invención, la reticulación mencionada en la etapa (2) anterior puede usar el siguiente método:

Mediante el uso de una reacción de intercambio de enlaces mercapto-disulfuro, se obtiene un producto reticulado sensible a la reducción mediante una reacción de intercambio entre 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) o glutatión (GSH) y un anillo de cinco miembros que contiene disulfuro en las nanopartículas obtenidas en la etapa (1); en que la cantidad de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) o glutatión (GSH) es de 5 a 30% del número de moles de lipoilo en el polímero anfifílico. Las nanopartículas pueden ser reticuladas y la estabilidad mejora grandemente en comparación con nanopartículas sin reticular y las nanopartículas no se disocian incluso aunque se diluyan 1.000 veces (inyección intravenosa simulada); y las nanopartículas son estables en una solución acuosa de sal de cloruro de sodio 2 M y el tamaño de partícula no cambia.

La capa hidrófoba del polímero anfifílico anteriormente mencionado puede tener un pequeño contenido de fármacos moleculares y formar nanopartículas con contenido de fármaco mediante reticulación para aumentar la estabilidad de las nanopartículas con contenido de fármaco. Por tanto, otro objeto de la presente invención es proporcionar adicionalmente una aplicación del polímero anfifílico anteriormente mencionado en la preparación de vehículos para fármacos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una nanopartícula con contenido de fármaco, que comprende un vehículo y un pequeño fármaco anticancerígeno molecular incluido en el vehículo, estando compuesto dicho vehículo por el polímero anfifílico según la presente invención, y estando compuesta una capa hidrófila externa de dicho vehículo por ácido hialurónico, y estando compuesta una capa hidrófoba interna de dicho vehículo por la cadena lateral (por ejemplo, éster metílico de lisina-lipoilo).

Particularmente, con el fin de aumentar la estabilidad de las nanopartículas con contenido de fármaco *in vivo*, el anillo de cinco miembros de lipoilo en el vehículo puede ser reticulado para obtener una nanopartícula con contenido de fármaco. Por tanto, en una realización particular de la presente invención, se proporciona una nanopartícula con

- 5 contenido de fármaco que comprende un vehículo y un pequeño fármaco anticancerígeno molecular ubicado en el vehículo, estando compuesto dicho vehículo por dicho polímero anfifílico, y estando compuesta una capa hidrófila externa de dicho vehículo por ácido hialurónico y estando compuesta una capa hidrófoba interna de dicho vehículo por anillos de cinco miembros reticulados (por ejemplo, anillos de cinco miembros de éster metílico de lisina-lipoilo) de la cadena lateral.
- En una realización de la presente invención, el fármaco anticancerígeno molecular pequeño se puede seleccionar entre, pero sin limitación, doxorubicina, paclitaxel, curcumina, docetaxel, camptotecina, mitomicina, daunomicina, bleomicina, calicheanom, maytansinoides, adriamicina, epirubicina o daunorubicina, etc.
- 10 En una realización preferida de la presente invención, la 2-cintroducción de los fármacos anticancerígenos moleculares pequeños es de 40% a 91%; el contenido de introducción del fármaco ("DLC") de las nanopartículas con contenido de fármacos es de 11% a 22%.
- En una realización preferida de la presente invención, el tamaño de partículas de las nanopartículas con contenido de fármaco es de 50-300 nm y la distribución del tamaño de partículas es de 0,02-0,30.
- 15 La presente invención proporciona adicionalmente un método para preparar las nanopartículas con contenido de fármaco anteriormente mencionadas, que comprende las etapas de:
- (1) disolver un fármaco molecular pequeño en una solución orgánica y seguidamente agitar conjuntamente con una solución orgánica del polímero anfifílico y seguidamente añadir solución de tampón fosfato gota a gota y agitar la mezcla resultante durante 0,5 h, seguido de diálisis, para obtener nanopartículas con contenido del fármaco;
- 20 (2) usando una reacción de intercambio de enlaces mercapto-disulfuro, realizar reticulación química sobre un anillo de cinco miembros que contiene disulfuro en las nanopartículas obtenidas en la etapa (1) con 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT), en que la cantidad de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) es de 5 a 30% del número de moles de lipoilo en el polímero anfifílico.
- Las nanopartículas con contenido de fármaco obtenidas mediante el método anterior son nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas, que pueden mejorar la estabilidad del fármaco en circulación sanguínea *in vivo*.
- 25 El vehículo de fármaco de molécula pequeña compuesta por el polímero anfifílico anteriormente mencionado tiene una propiedad de dirección a diana activa así como sensibilidad de reducción, puede mejorar la estabilidad del fármaco en la circulación sanguínea *in vivo* y aumentar la cantidad de fármaco endocitosado por células tumorales; al mismo tiempo, las nanopartículas reticuladas de polímero anfifílico son rápidamente desreticuladas y liberan rápidamente fármaco en presencia de un agente reductor intracelular, mejorando así la biodisponibilidad del fármaco; además, las nanopartículas reticuladas de polímero anfifílico pueden ser fácilmente excretadas. El agente reductor usado para la desreticulación se puede seleccionar entre moléculas que contienen mercapto como 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT), glutatión (GSH) o compuestos que contienen fósforo trivalente como tris-(2-cloroetil)-fosfato (tris-(2-carboxietil)-fosfina, TCEP); por ejemplo, en que la concentración de glutatión es 10 mM, las nanopartículas reticuladas compuestas del polímero anfifílico son rápidamente desriticuladas y liberan rápidamente fármaco para tratar enfermedades.
- 30 35
- En la presente invención, un núcleo hidrófobo de las nanopartículas compuestas por polímeros anfifílicos es introducido con fármacos anticancerígenos moleculares pequeños; un ácido hialurónico de corteza hidrófila tiene una capacidad de dirigir a diana componentes activos tumorales, se puede unir a receptor CD44 en la superficie de una diversidad de células cancerígenas y es eficazmente endocitosado en células tumorales por medio de endocitosis mediada por receptores; aparte de esto, la reticulación puede aumentar la estabilidad de las nanopartículas con contenido de fármaco durante el suministro *in vivo*; después de entrar en las células tumorales, las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas son sensibles al entorno reductor intracelular de las células tumorales y pueden fácilmente desreticuladas y liberar fármacos, destruyendo así eficazmente células cancerígenas.
- 40
- Por tanto, otro objeto de la presente invención es proporcionar una aplicación de las nanopartículas con contenido de fármaco anteriormente mencionadas que comprendes un vehículo y un fármaco anticancerígeno molecular pequeño introduciéndolo en el vehículo en la preparación de un fármaco antitumoral. En una realización preferida, el tumor es preferentemente un tumor en el que el receptor CD44 es sobreexpresado en la superficie celular.
- 45
- Teniendo en cuenta la puesta en práctica de las realizaciones anteriormente mencionadas, la presente invención tiene las siguientes ventajas en comparación con la técnica anterior.
- 50
1. La presente invención divulga un vehículo para fármacos basado en polímero anfifílico de ácido hialurónico por primera vez, que tiene una elevada eficacia de contenido de fármaco, es estable en la circulación *in vivo*, tiene una elevada relación de utilización del fármaco, buena biocompatibilidad y pocos efectos secundarios, y puede ser fácilmente excretado.
- 55
2. El polímero anfifílico basado en ácido hialurónico divulgado en la presente invención contiene un grupo lipoilo como la parte hidrófoba y por medio del autoensamblado y reticulación del primero, se pueden obtener

nanopartículas reticuladas estables; dichas nanopartículas no son fáciles de disociarse fuera de las células y en la sangre, asegurando así la estabilidad de los fármacos encapsulados por las nanopartículas y aumentando el tiempo de circulación *in vivo* de los fármacos; esto supera los inconvenientes de la técnica anterior, es decir, el fármaco se puede ser fácilmente evacuado *in vivo* y tiene una baja eficiencia de transporte; las nanopartículas proporcionadas en la presente invención tienen una sensibilidad de reducción y son desreticuladas en un entorno reductor, liberan los fármacos y transfieren eficazmente los fármacos a un tejido diana.

3. El vehículo de fármacos de polímero anfífilico basado en ácido hialurónico divulgado en la presente invención contiene ácido hialurónico como una parte hidrófila y puede dirigir activamente a diana a una superficie de una célula tumoral y ser endocitosado en células tumorales por medio de endocitosis mediada por receptores, lo que aumenta eficazmente la capacidad de endocitosis celular y resuelve el problema de la baja capacidad de absorción celular para los vehículos ordinarios de tamaño nanométrico.

4. El vehículo para fármacos de polímero anfífilico basado en ácido hialurónico divulgado en la presente invención puede entrar eficazmente en células tumorales sin modificación de las células diana y alcanza una elevada velocidad de enriquecimiento en el sitio del tumor; en el que, HA-Lys-LA alcanza un 12,71% de ID/g; cuando la cadena lateral es $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-NH-lipoilo}$, su velocidad de enriquecimiento en el sitio del tumor es significativamente mayor que HA-Lys-LA (a saber, éster metílico de HA-lisina-LA); particularmente HA-(aminohexilamino)-LA, su velocidad de enriquecimiento alcanza 15,3% ID/g, bastante mayor que el nivel de la técnica anterior; tiene una elevada citotoxicidad para células tumorales, células tumorales resistentes a los medicamentos y células madre tumorales.

5. El vehículo para fármacos divulgado en la presente invención puede ser preparado de forma sencilla y tiene buena biocompatibilidad, metabolitos inocuos para el cuerpo humano y una amplia gama de fuentes, una diversidad de grupos funcionales en unidades repetidas, es fácil de modificar y se puede desreticular rápidamente y disociar en un sitio del tumor de forma que el fármaco se libere rápidamente, produciendo así un efecto terapéutico eficaz, por lo que tiene una gran capacidad potencial de aplicación en la liberación controlada de una zona de fármacos.

6. Para el vehículo para fármacos de polímero anfífilico basado en ácido hialurónico descrito en la presente invención, particularmente cuando la cadena lateral del polímero anfífilico basado en ácido hialurónico es ornitina-lipoilo, HA-DOX tiene un efecto terapéutico muy significativo sobre tumores LP1. Como se muestra mediante la fig. 13A, en comparación con un grupo de solución de tampón fosfato (PBS), después de un tratamiento con HA-DOX durante 25 días, desaparece un 2/5 del volumen tumoral; aunque un grupo de fármaco libre puede conseguir también un efecto similar, los ratones no son tolerados para el fármaco libre y el peso corporal del ratón en el grupo del fármaco libre disminuye significativamente después de aproximadamente 12 días, mientras que el grupo de HA-DOX y el grupo PBS tienen un efecto parecido sobre el peso corporal de los ratones y el cambio de peso todavía no es significativo después de la administración durante 24 días (como se muestra en la fig. 13C); con referencia a las figs. 13A y 13D, se puede encontrar adicionalmente que todos los ratones mueren después de la administración de fármaco libre durante aproximadamente 12 a 15 días, mientras que los ratones en el grupo de HA-DOX sobreviven durante más de 50 días, lo que indica que el HA-DOX tiene un efecto de tratamiento elevado sobre tumor LP1 de ratones y al mismo tiempo el ratón tiene una buena tolerancia para el HA-DOX.

7. El vehículo del fármaco del polímero anfífilico basado en ácido hialurónico divulgado en la presente invención, particularmente nanopartículas reticuladas de éster metílico de HA-ornitina-LA con contenido de fármaco tienen alta velocidad de enriquecimiento en el sitio del tumor y un período de tiempo de circulación prolongado en el cuerpo de los ratones.

8. Las nanopartículas de polímero anfífilico basado en ácido hialurónico, particularmente cuando la cadena lateral es ornitina, éster de ornitina o su derivado lipoilo, $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-NH-lipoilo}$, las nanopartículas resultantes tienen un tamaño de partículas pequeño y una distribución del tamaño medio de partículas de 0,15 o menos. Además, una nanopartícula reticulada con contenido de fármaco preparada a partir de las mismas tiene una eficacia de contenido de fármaco y contenido de introducción de fármaco que están ambos significativamente mejorados en comparación con el éster metílico de HA-lisina-LA. Cuando el contenido de introducción del fármaco teórico es del 20%, la eficacia de introducción de fármaco nanopartículas de éster metílico de HA-lisina-LA ($M_{nHA} = 35$ kDa, DS = 10%) para doxorubicina es de 54,5% y el contenido de introducción del fármaco real es de 12%. En las condiciones de un contenido de introducción de fármaco idéntico, el éster metílico de HA-ornitina-LA ($M_{nHA} = 35$ kDa, DS = 10%), la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas para doxorubicina es de 79,57% y el contenido de introducción de fármaco real es de un valor elevado de 15,56%, HA-lisina-LA ($M_{nHA} = 35$ kDa, DS = 10%), la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas para doxorubicina es 81,5%, y el contenido de introducción de fármaco real es un valor elevado de 16,38%.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es un diagrama que muestra una vía sintética de un polímero HA-Lys-LA en los ejemplos;

La fig. 2 es un gráfico que muestra resultados del cambio de tamaño de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA bajo una dilución elevada y condiciones de salinidad elevada en el ejemplo 15;

La fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados de liberación *in vitro* de nanopartículas reticuladas HA-Lys-LA con contenido de DOX bajo la activación de glutatión en el ejemplo 21;

5 La fig. 4 es un dibujo que muestra los resultados de liberación de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA reticuladas con HA-Lys-LA con contenido de fármaco, DOX, y nanopartículas reticuladas encapsuladas HA en células MCF-7/ADR (células de cáncer de mama humano);

La fig. 5 es un gráfico que muestra resultados de la citotoxicidad de diferentes nanopartículas de HA-Lys-LA para células MCF-7/ADR en el ejemplo 50;

La fig. 6 es un gráfico que muestra resultados de circulación sanguínea de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX en ratones en el ejemplo 54;

10 La fig. 7 es un dibujo que muestra los resultados de formación de imágenes *in vivo* de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de Cy7 en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumor MCF-7/ADR en el ejemplo 54;

La fig. 8 es un gráfico que muestra resultados de la biodistribución de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX en órganos de ratones desprovistos de inmunidad que tumor MCF-7/ADR en el ejemplo 58;

15 La fig. 9 es un gráfico que muestra resultados de cambios de crecimiento de tumor en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumor MCF-7/ADR tratados con nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX en el ejemplo 59;

La fig. 10 muestra una fórmula estructural de conjugado HA-Lys y sus espectros de ^1H RMN (400 MHz, D_2O);

La fig. 11 muestra vías generales de la preparación en los ejemplos 24 a 27;

20 La fig. 12 muestra vías generales de la preparación en los ejemplos 28 a 34;

Las figs. 13A a 13D muestran resultados de cambios de crecimiento tumoral en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumor LP1 (mieloma múltiple) tratados con nanopartículas reticuladas de HA-Om-LA (HA-ornitina-LA) con contenido de DOX en el ejemplo 60; en que las figs. 13A y 13B muestran un cambio relativo del volumen del tumor, la fig. 13C muestra un cambio relativo en el peso corporal de ratones desprovistos de inmunidad, la fig. 13D muestra una tasa de supervivencia de los ratones;

25 La fig. 14 es un gráfico que muestra los resultados de la circulación de nanopartículas reticuladas éster metílico de HA-ornitina-LA con contenido de DOX en ratones del ejemplo 61;

La fig. 15 es un gráfico que muestra la biodistribución de nanopartículas reticuladas de HA-(aminohexilamino)-LA con contenido de DOX en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumor MCF-7/ADR en el ejemplo 62.

30 Descripción detallada

La presente invención se describe adicionalmente a continuación haciendo referencia a los dibujos y ejemplos.

Ejemplo 1. Síntesis de un polímero de éster metílico de ácido hialurónico-lisina polímero-ácido lipoico (denominado HA-Lys-LA) ($M_{n\text{Ha}} = 35$ kDa, DS = 10%)

35 La fig. 1 es un diagrama que muestra una vía sintética de un HA-Lys-LA polímero en los ejemplos. En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de hidrocloreto de éster metílico de N-terc-butoxicarbonil-L-lisina (H-Lys(Boc)-OMe·HCl) (240 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (460 mg, 2,40 mmol), N-hidroxisuccinimida (NHS) (140 mg, 1,22 mmol) y solución de hidrocloreto de éster metílico de N-terc-butoxicarbonil-Lisina con separación de hidrocloreto (H-Lys(Boc)-OMe)/metanol a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). Se ajustó el pH de la mezcla a 8,5 y seguidamente se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El aducto de éster metílico de terc-butoxicarbonil-lisina de ácido hialurónico resultante (HA-Lys(OMe)-Boc) se aisló mediante diálisis extensiva seguida de liofilización. Seguidamente, se añadió por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al sólido obtenido de HA-Lys(OMe)-Boc. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0 y seguidamente se sometió a diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era de éster metílico de ácido hialurónico-lisina (HA-Lys(OMe)), en el que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina (Lys(OMe)) era de 10%.

50 Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μmol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (6 mg, 29 μmol amino) disuelta en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido

lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anterior se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 27 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (4 mg, 33 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 95%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era de ácido hialurónico-éster metílico de lisina-ácido lipoico (HA-Lys-LA), en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 10%.

10 Ejemplo 2. Síntesis de un HA-Lys-LA polímero (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 5%)

Se añadió en primer lugar trietilamina (42 mg, 0,42 mmol) a una solución de H-Lys(Boc)-OMe·HCl (120 mg, 0,40 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mol) y solución de H-Lys(Boc)-OMe/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Lys(OMe)-Boc. Se añadió por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Lys(OMe)-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0 seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 89%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys(OMe), en la que el grado de sustitución (DS) de Lys(OMe) era de 5%.

20 Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (6 mg, 29 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para dar un anhídrido de ácido lipoico.

25 El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 14 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 33 μ mol) disuelto en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 93%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 5%.

30 Ejemplo 3. Síntesis de un HA-Lys-LA polímero (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 28%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (42 mg, 0,42 mmol) a una solución de H-Lys(Boc)-OMe·HCl (480 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de H-Lys(Boc)-OMe/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Lys(OMe)-Boc. Se añadieron por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al H-Lys(Boc)-OMe sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 90%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys(OMe), en la que el grado de sustitución (DS) de Lys(OMe) era de 28%.

40 Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado al vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

45 El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 91%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 28%.

50 Ejemplo 4. Síntesis de un HA-Lys-LA polímero (M_{nHa} = 8,9 kDa, DS = 12%)

55 En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de H-Lys(Boc)-OMe·HCl (240 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de H-Lys(Boc)-OMe /metanol separada con hidrocloreuro

a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Lys(OMe)-Boc. Se añadió por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al H-Lys(Boc)-OMe sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys(OMe), en la que el grado de sustitución (DS) de Lys(OMe) era de 12%.

Se disolvió ácido lipoico (15 mg, 70 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (7 mg, 35 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 32 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (5 mg, 40 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 94%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 12%

Ejemplo 5. Síntesis de HA-Lys-LA polímero (M_{nHa} = 8,9 kDa, DS = 10%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de H-Lys(Boc)-OMe·HCl (240 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de H-Lys(Boc)-OMe separada con hidrocloreuro/ metanol a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Lys(OMe)-Boc. Se añadieron por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Lys(OMe)-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización, para proporcionar HA-Lys(OMe).

Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (0,384 g, 1,86 mmol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se evaporó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 27 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 33 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 95%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 10%.

Ejemplo 6. Síntesis de un HA-Lys-LA polímero (M_{nHa} = 100 kDa, DS = 10%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de H-Lys(Boc)-OMe·HCl (240 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de H-Lys(Boc)-OMe/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Lys(OMe)-Boc. Se añadieron por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) para al HA-Lys(OMe)-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys(OMe), en la que el grado de sustitución (DS) de Lys(OMe) era de 10%.

Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (6 mg, 29 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 27 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 33 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un

baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 10%.

Ejemplo 7. Síntesis de HA-Lys-LA polímero ($M_{nHa} = 300$ kDa, DS = 10%)

5 En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de H-Lys(Boc)-OMe-HCl (240 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de H-Lys(Boc)-OMe/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Lys(OMe)-Boc. Se añadieron por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Lys(OMe)-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys(OMe), en la que el grado de sustitución (DS) de Lys(OMe) era de 10%.

15 Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (6 mg, 29 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

20 El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Lys(OMe) (60 mg, 27 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 33 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 95%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Lys-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de éster metílico de lisina-lipoilo era de 10%.

Ejemplo 8. Preparación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%)

30 Se prepararon nanopartículas de HA-Lys-LA polímero mediante diálisis. El procedimiento detallado fue como sigue: se disolvieron 5 mg de HA-Lys-LA polímero (DS = 10%) en 1 ml de formamida y se le añadieron gota a gota 4,0 ml de PBS (10 mM, pH 7,4) a 25 °C bajo agitación. Posteriormente la solución resultante se agitó durante 1 h, se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a una solución de PBS (PBS) (10 mM, pH 7,4) durante 24 h. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 198 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,11.

Ejemplo 9. Preparación de nanopartículas HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 5%)

35 Se prepararon nanopartículas de HA-Lys-LA polímero mediante diálisis. El procedimiento detallado fue como sigue: se disolvieron 5 mg de HA-Lys-LA polímero (DS = 5%) en 1 ml de formamida y se le añadieron gota a gota 4,0 ml de PBS (10 mM, pH 7,4) a 25 °C bajo agitación. Posteriormente la solución resultante se agitó durante 1 h, se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS (10 mM, pH 7,4) durante 24 h. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 237 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,23.

40 Ejemplo 10. Preparación de nanopartículas HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%)

45 Se prepararon nanopartículas de HA-Lys-LA polímero mediante diálisis. El procedimiento detallado fue como sigue: se disolvieron 5 mg de HA-Lys-LA polímero (DS = 28%) en 1 ml de formamida, y se le añadieron gota a gota 4,0 ml de PBS (10 mM, pH 7,4) a 25 °C bajo agitación. Posteriormente la solución resultante se agitó durante 1 h, se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS (10 mM, pH 7,4) durante 24 h. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 178 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,13.

Ejemplo 11. Preparación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 5%)

50 Se prepararon nanopartículas de HA-Lys-LA polímero mediante diálisis. El procedimiento detallado fue como sigue: se disolvieron 5 mg de HA-Lys-LA polímero (DS = 5%) en 1 ml de formamida y se le añadieron gota a gota 4,0 ml de PBS (10 mM, pH 7,4) a 25 °C bajo agitación. Posteriormente la solución resultante se agitó durante 1 h, se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS (10 mM, pH 7,4) durante 24 h. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 203 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,25.

Ejemplo 12. Preparación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 13%)

Se prepararon nanopartículas de HA-Lys-LA polímero mediante diálisis. El procedimiento detallado fue como sigue: se disolvieron 5 mg de HA-Lys-LA polímero (DS = 13%) en 1 ml de formamida y se le añadieron gota a gota 4,0 ml de PBS (10 mM, pH 7,4) a 25 °C bajo agitación. Posteriormente la solución resultante se agitó durante 1 h, se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS (10 mM, pH 7,4) durante 24 h. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 185 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,09.

Ejemplo 13. Preparación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 25%)

Se prepararon nanopartículas de HA-Lys-LA polímero mediante diálisis. El procedimiento detallado fue como sigue: se disolvieron 5 mg de HA-Lys-LA polímero (DS = 25%) en 1 ml de formamida, y se le añadieron gota a gota 4,0 ml de PBS (10 mM, pH 7,4) a 25 °C bajo agitación. Posteriormente la solución resultante se agitó durante 1 hora, se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS (10 mM, pH 7,4) durante 24 h. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 169 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,10.

Ejemplo 14. Reticulación de nanopartículas HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 5%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 4 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 219 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,27.

Ejemplo 15. Reticulación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 7 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. La fig. 2 muestra los resultados del cambio de tamaño de las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA bajo una dilución elevada y en condiciones de salinidad elevada. Se puede observar que las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 175 nm y una distribución de tamaño de partículas de 0,12 y que tenían una estabilidad significativa frente a una dilución elevada (inyección intravenosa simulada) y una elevada salinidad (2M).

Ejemplo 16. Reticulación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 152 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,16.

Ejemplo 17. Reticulación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 5%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 4 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 199 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,23.

Ejemplo 18. Reticulación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 13%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas de polímero anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 7 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 164 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,11.

Ejemplo 19. Reticulación de nanopartículas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 25%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol

(DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 148 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,23.

- 5 Ejemplo 20. Desreticulación de las nanopartículas polímeras reticuladas de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%) mediante glutatión en exceso

Bajo protección con nitrógeno, se añadió glutatión (GSH) pesado a una celda de muestras de vidrio de 2,0 ml de nanopartículas reticuladas polímeras de HA-Lys-LA (0,001 mg/ml) de forma que la concentración de glutatión final fuera de 10 mM, y se preparó también muestra testigo paralela sin glutatión; seguidamente, la celda de muestras de vidrio se selló con un tapón de caucho y se agitó uniformemente y se colocó en un agitador termostataado a 37 °C (200 rpm). El tamaño de partículas de las partículas se siguió mediante dispersión de luz láser dinámica (DSL) a 37 °C durante un período de tiempo seleccionado. Los resultados mostraron que el tamaño de partículas de las nanopartículas reticuladas aumentó desde los 175 nm originales hasta varios miles de nanómetros después de ser afectadas por glutatión 10 mM durante 12 h y el tamaño de partículas disminuyó hasta varios nanómetros después de una dilución 1.000 veces, indicando que las nanopartículas reticuladas estaban desreticuladas.

Ejemplo 21. Introducción de fármaco anticancerígeno molecular pequeño doxorubicina y su liberación activada por glutatión

Una solución de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 5%, 10%, 28%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) se mezcló con doxorubicina (DOX)/dimetilsulfóxido (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron gota a gota 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25 °C. Después ser agitada durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS, para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco formada se tomó en medio volumen y se ajustó a pH 8,5. Se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se diluyeron 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de GSH (10 mM) a una parte y un volumen igual de PBS puro se añadió a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis y se colocaron en un agitador termostataado a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de GSH a la misma temperatura y la última se sumergió en 25 ml de PBS (20 mM) a la misma temperatura; después de un período de tiempo dado, se tomaron 6 ml de dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de una solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

Determinación de la eficacia de introducción de fármaco en nanopartículas polímeras de DOX: se tomó una cierta cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas y sin reticular y el agua en la solución se separó mediante un método de liofilización; seguidamente, se le añadieron 0,5 ml de formamida y el sólido liofilizado se sometió a fusión completamente por ultrasonidos durante 1 h; se tomaron 20 ml de la solución resultante, a la que se añadieron 3 ml de formamida; después de un ensayo de fluorescencia, se calcularon la eficacia de introducción de fármaco y el contenido de introducción de fármaco con referencia a una curva estándar de doxorubicina.

Eficacia de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso de doxorubicina en la alimentación) \times 100%

45 Contenido de introducción de fármaco = (peso de la doxorubicina introducida en nanopartículas/peso total de las nanopartículas en blanco y doxorubicina en la alimentación) \times 100%

Cuando el contenido de introducción de fármaco teórico es 20%, la eficacia de introducción de fármaco de las nanopartículas reticuladas HA-Lys-LA₁₀ respecto a doxorubicina era de 54,5% y el contenido de introducción de fármaco real era de 12%.

50 La fig. 3 es un gráfico que muestra la liberación *in vitro* de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX activada por glutatión. Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se desreticularon rápidamente en GSH 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente 86% de DOX en 22 h; mientras que las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX fueron muy estables en un entorno exento de GSH y se liberó un poco de DOX, solamente un 24%.

55 Ejemplo 22. Introducción de fármaco anticancerígeno molecular pequeño doxorubicina y su liberación activada por glutatión

Una solución de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 40%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) se mezcló con doxorubicina (DOX)/dimetilsulfóxido (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25 °C. Después de ser agitada durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS, para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármacos formada se tomó en medio volumen y se ajustó a pH 8,5. Se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar DTT sin reaccionar.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se diluyeron 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de GSH (10 mM) a una parte, y un volumen igual de PBS puro se añadió a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis y se colocaron en un agitador termostatado a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de GSH a la misma temperatura, y la última se sumergió en 25 ml de PBS (20 mM) a la misma temperatura; después de un período de tiempo dado, se tomaron 6 ml de dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

Determinación de la eficacia de introducción de fármaco de DOX en nanopartículas polímeras: se tomó una cierta cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas y sin reticular, y el agua en la solución se separó mediante un procedimiento de liofilización; seguidamente se le añadieron 0,5 ml de formamida y el sólido liofilizado se sometió a fusión completamente por ultrasonidos durante 1 h; se tomaron 20 ml de la solución resultante, a los que se añadieron 3 ml de formamida; después del ensayo de fluorescencia, se calcularon la eficacia de introducción de fármaco y el contenido de introducción de fármaco con referencia a una curva estándar de doxorubicina.

Eficacia de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso de doxorubicina en la alimentación) \times 100%

Contenido de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso total de las nanopartículas en blanco y doxorubicina en la alimentación) \times 100%

Cuando el contenido de introducción de fármaco teórico es de 25%, la eficiencia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas HA-Lys-LA₄₀ para doxorubicina fue de 74,5% y el contenido de introducción de fármaco real fue de 20%.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se reticularon rápidamente en GSH 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente un 78% DOX fue lanzado en 22 h; mientras que las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX fueron muy estables en un entorno exento de GSH y se liberó poco de DOX, solamente un 19%.

Ejemplo 23. Introducción fármaco anticancerígeno molecular pequeño paclitaxel (PTX) y su liberación activada por DTT

Una solución de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) se mezcló con PTX/N,N'-dimetilformamida (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25 °C. Después ser agitada durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS, para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármacos formada se tomó en medio volumen y se ajustó a pH 8,5. Se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar.

Las NP (nanopartículas) reticuladas con contenido de PTX se diluyeron 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de DTT (10 mM) a una parte, y se añadió un volumen igual de PBS puro a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis colocada en un agitador termostatado a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de DTT a la misma temperatura, y la última se sumergió en 25 ml de PBS (10 mM) a la misma temperatura; después de un período de tiempo dado, se tomaron 6 ml de dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

Determinación de la eficacia de introducción de fármaco de PTX en nanopartículas polímeras: se tomó una cierta

cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas y sin reticular, y se separó el agua en la solución mediante un método de liofilización; seguidamente se le añadieron 0,5 ml de acetonitrilo para realizar ultrasonidos durante 1 h; se realizó una filtración; se midió la intensidad de adsorción a 227 nm mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con una mezcla de acetonitrilo y agua (1/1, v/v) como fase móvil, y se calculó la eficacia de introducción de fármaco con referencia a la curva estándar de paclitaxel.

5 Eficacia de introducción de fármaco = (peso de paclitaxel en nanopartículas/peso de paclitaxel en la alimentación) × 100%

Contenido de introducción del fármaco = (peso de paclitaxel en nanopartículas/peso total de nanopartículas y paclitaxel en la alimentación) × 100%

10 Como se muestra mediante los resultados, el PTX no afectó a la formación de nanopartículas y el tamaño sustancialmente no cambió; aparte de esto, cuando el contenido de introducción de fármaco teórico es de 30%, la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA₁₀ respecto a paclitaxel era de 67,2% y el contenido de introducción de fármaco real era de 22%. Las nanopartículas reticuladas con contenido de PTX se desreticularon rápidamente en DTT 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente 82% de PTX en 22 h.

15 Ejemplo 24. Un método para sintetizar un HA-(aminoetilamino)-LA polímero ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 5%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (42,5 mg, 0,42 mmol) a una solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)-HCl$ (64,08 mg, 0,40 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)$ /metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-NHCH₂CH₂NH-Boc. Se añadió un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) por orden al HA-NHCH₂CH₂NH-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización, para proporcionar HA-NHCH₂CH₂NH₂.

25 Se disolvió ácido lipoico (6 mg, 29 μmol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadieron a un matraz sellado a vacío Schlenk de 13 ml y se añadió DCC (0,192 g, 0,93 mmol) disuelto en 0,5 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

30 El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-NHCH₂CH₂NH₂ (114,4 mg, 15 μmol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (2 mg, 16,5 μmol) disueltas en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 97%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-(aminoetilamino)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de aminoetilamino-lipoilo era de 5%.

35 Ejemplo 25. Un método para sintetizar un HA-(aminoetilamino)-LA polímero ($M_{nHa} = 100$ kDa, DS = 10%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)-HCl$ (128,2 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)$ /metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-NHCH₂CH₂NH-Boc. Se añadió un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) por orden al HA-NHCH₂CH₂NH-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-NHCH₂CH₂NH₂, en la que el grado de sustitución (DS) de aminoetilamino era de 10%.

Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μmol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (6 mg, 29 μmol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-NHCH₂CH₂NH₂ (103,6 mg, 27 μmol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 33 μmol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por

orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-(aminoetilamino)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de aminoetilamino-lipoilo era de 10%.

Ejemplo 26. Un método para sintetizar un HA-(aminoetilamino)-LA polímero ($M_{nHa} = 37$ kDa, DS = 28%)

5 En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)-HCl$ (310,7 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)$ /metanol separada con hidrocloreuro con una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-NHCH₂CH₂NH-Boc. Se añadió un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) por orden al HA-NHCH₂CH₂NH-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-NHCH₂CH₂NH₂, en la que el grado de sustitución (DS) de aminoetilamino era de 28%.

15 Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

20 El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HANH-CH₂CH₂NH₂ (106 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-(aminoetilamino)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de aminoetilamino-lipoilo era de 28%.

Ejemplo 27. Un método para sintetizar un HA-(aminohexilamino)-LA polímero ($M_{nHa} = 400$ kDa, DS = 40%)

30 En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de $NH_2-(CH_2CH_2)_3NH(Boc)-HCl$ (310,7 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de $NH_2-CH_2CH_2NH(Boc)$ /metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 96 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-NH(CH₂CH₂)₃NH-Boc. Se añadió un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) por orden al HA-NH(CH₂CH₂)₃NH-Boc sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 89%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-NH(CH₂CH₂)₃NH₂, en la que el grado de sustitución (DS) de aminohexilamino era de 40%.

40 Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

45 El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-NH(CH₂CH₂)₃NH₂ (79 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-(aminohexilamino)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de aminohexilamino-lipoilo era de 40%.

Ejemplo 28. Un método para sintetizar un HA-ornitina-LA polímero ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 10%)

50 En primer lugar, se añadió trietilamina (85 mg, 0,84 mmol) a una solución de Orn(Boc)-HCl (215 mg, 0,80 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxi) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc). Se añadió un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc) sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina (Orn) era de 10%.

Se disolvió ácido lipoico (12 mg, 58 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (6 mg, 29 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Orn(105,2 mg, 27 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (4 mg, 33 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1:1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina-lipoilo era de 10%.

Ejemplo 29. Un método para sintetizar un HA-ornitina-LA polímero (M_{nHa} = 8,9 kDa, DS = 28%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de Orn(Boc)-HCl (424,6 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc). Se añadió un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc) sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina (Orn) era 28%.

Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Orn(110,7 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1/1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina-lipoilo era de 28%.

Ejemplo 30. Un método para sintetizar un HA-Ornitina-LA polímero (M_{nHa} = 100 kDa, DS = 28%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de Orn(Boc)-HCl (424,6 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc). Se añadió por orden un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc) sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina (Orn) era de 28%.

Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Orn(110,7 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1/1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina-lipoilo era de 28%.

Ejemplo 31. Un método para sintetizar un HA-Ornitina-LA polímero ($M_{nHa} = 300$ kDa, DS = 40%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de Orn(Boc)-HCl (424,6 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)/metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 96 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc). Se añadieron un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc) sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 89%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina (Orn) era de 40%.

Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado al vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después del enfriamiento, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Orn(79,8 mg, 76 μ mol amino) disuelta en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1/1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina-lipoilo era de 40%.

Ejemplo 32. Un método para sintetizar un polímero HA-éster etílico de ornitina-LA ($M_{nHa} = 8,9$ kDa, DS = 5%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (42,5 mg, 0,42 mmol) a una solución de Orn(Boc)-OEt-HCl (107,5 mg, 0,40 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)-OEt /metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc)-OEt. Se añadieron un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc)-OEt sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización, para proporcionar HA-Orn(OEt).

Se disolvió ácido lipoico (6 mg, 29 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 13 ml y se añadió DCC (0,192 g, 0,93 mmol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron por orden HA-Orn(OEt) (115,5 mg, 15 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (2 mg, 16,5 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1/1) y agua por orden y se liofilizó. Rendimiento: 97%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn(OEt)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina(OEt)-lipoilo era de 5%.

Ejemplo 33. Un método para sintetizar un HA-éster metílico de ornitina-LA polímero ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de Orn(Boc)-OMe-HCl (402,5 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)-OMe /metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc)-OMe. Se añadieron un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc)-OMe sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn(OMe), en la que el grado de sustitución (DS) de Orn(OMe) era de 28%.

Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después del enfriamiento, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron HA-Orn(OMe) (110,6 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1/1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn(OMe)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina(OMe)-lipoilo era de 28%.

Ejemplo 34. Un método para sintetizar un HA-éster butílico de ornitina-LA polímero (M_{nHa} = 500 kDa, DS = 28%)

En primer lugar, se añadió trietilamina (167,9 mg, 1,66 mmol) a una solución de Orn(Boc)-OBu·HCl (469,0 mg, 1,58 mmol)/metanol anhidro (2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadieron por orden EDC (460 mg, 2,40 mmol), NHS (140 mg, 1,22 mmol) y solución de Orn(Boc)-OBu /metanol separada con hidrocloreuro a una solución acuosa de HA (300 mg, 0,79 mmol de grupo carboxilo) (6 ml). La solución se ajustó a pH 8,5. La mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de diálisis y liofilización, para obtener HA-Orn(Boc)-OBu. Se añadieron un total de 6 ml de ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico 2 M (v/v, 1:1) al HA-Orn(Boc)-OBu sólido obtenido. La reacción se llevó a cabo bajo agitación durante 6 h. Después de que terminó la desprotección, la solución se ajustó a pH 7,0, seguido de diálisis y liofilización. Rendimiento: 92%. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn(OBu), en la que el grado de sustitución (DS) de Orn(OBu) era de 28%.

Se disolvió ácido lipoico (32 mg, 152 μ mol) en 2,0 ml de diclorometano y se añadió a un matraz sellado a vacío Schlenk de 25 ml y se añadió DCC (16 mg, 76 μ mol) disuelto en 1,0 ml de diclorometano al matraz sellado bajo una atmósfera de nitrógeno; el matraz se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 22 h. Después de enfriar, la urea formada en la reacción se separó por filtración. El filtrado se concentró a través de evaporación rotatoria y el disolvente se separó, para proporcionar un anhídrido de ácido lipoico.

El anhídrido de ácido lipoico anteriormente obtenido se disolvió en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida que había experimentado un tratamiento anhidro. Se añadieron HA-Orn(OBu) (113,8 mg, 76 μ mol amino) disuelto en 5 ml de formamida, el anhídrido de ácido lipoico y 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 83 μ mol) disuelta en 0,5 ml de N,N'-dimetilformamida a un matraz de tres bocas de 50 ml bajo una atmósfera de nitrógeno; el reactor se colocó en un baño de aceite a 30 °C y se agitó durante 48 h, seguido de diálisis en agua/etanol (1/1) y agua por orden y se liofilizó. Los resultados de RMN mostraron que la estructura era HA-Orn(OBu)-LA, en la que el grado de sustitución (DS) de ornitina (OBu)-lipoilo era de 28%.

Ejemplo 35. Preparación de nanopartículas de HA-(aminoetilamino)-LA (M_{nHa} = 37 kDa, DS = 28%)

Se prepararon nanopartículas de HA-(aminoetilamino)-LA (M_{nHa} = 37 kDa, DS = 28%) según el método del ejemplo 9. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 132 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,08.

Ejemplo 36. Preparación de nanopartículas de HA-(aminohexilamino)-LA (M_{nHa} = 400 kDa, DS = 40%)

Se prepararon nanopartículas de HA-(aminohexilamino)-LA (M_{nHa} = 400 kDa, DS = 40%) según el método del ejemplo 9. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas fuera de 145 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,11.

Ejemplo 37. Preparación de nanopartículas de HA-ornitina-LA (M_{nHa} = 100 kDa, DS = 28%)

Se prepararon nanopartículas de HA-ornitina-LA (M_{nHa} = 100 kDa, DS = 28%) según el método del ejemplo 9. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 140 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,07.

Ejemplo 38. Preparación de nanopartículas de HA-ornitina(OMe)-LA (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 28%)

Se prepararon nanopartículas de HA-ornitina(OMe)-LA (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 28%) según el método del ejemplo 9. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 148 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,06.

Ejemplo 39. Preparación de nanopartículas de HA-ornitina(OBu)-LA (M_{nHa} = 500 kDa, DS = 28%)

Se prepararon nanopartículas de HA-ornitina(OBu)-LA (M_{nHa} = 500 kDa, DS = 28%) según el método del ejemplo 9. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas era de 151 nm y la distribución del tamaño de partículas era de 0,12.

Ejemplo 40. Reticulación de nanopartículas de HA-(aminoetilamino)-LA (M_{nHa} = 37 kDa, DS = 28%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, se ajustó una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1 mg/ml de 1,4-ditio-D,L-triobutanol (DTT) después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h

para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 150 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,13 y tenían una estabilidad significativa frente a una dilución elevada (inyección intravenosa simulada) y una elevada salinidad (2M).

5 Ejemplo 41. Reticulación de nanopartículas de HA-(aminohexilamino)-LA ($M_{nHa} = 400$ kDa, DS = 40%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, se ajustó una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 149 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,13 y tenían una estabilidad significativa frente a una dilución elevada (inyección intravenosa simulada) y una elevada salinidad (2M).

Ejemplo 42. Reticulación de nanopartículas HA-ornitina-LA ($M_{nHa} = 100$ kDa, DS = 28%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 137 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,08 y tenían una estabilidad significativa frente a una dilución elevada (inyección intravenosa simulada) y una elevada salinidad (2M).

Ejemplo 43. Reticulación de nanopartículas de HA-ornitina(OMe)-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 132 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,09 y tenían una estabilidad significativa frente a una dilución elevada (inyección intravenosa simulada) y una elevada salinidad (2M).

Ejemplo 44. Reticulación de nanopartículas de HA-ornitina(OBu)-LA ($M_{nHa} = 500$ kDa, DS = 28%)

Con el fin de obtener nanopartículas polímeras reticuladas, una solución de las nanopartículas polímeras anteriormente formadas (0,5 mg/ml, 2 ml) se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 20 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas reticuladas resultantes se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar. Las nanopartículas reticuladas tenían un tamaño de 141 nm y una distribución del tamaño de partículas de 0,14 y tenían una estabilidad significativa frente a una dilución elevada (inyección intravenosa simulada) y una elevada salinidad (2M).

40 Ejemplo 45. Introducción de fármaco anticancerígeno molecular pequeño doxorubicina (DOX) y su liberación activada por glutatión

Una solución de HA-ornitina(OMe)-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%, 10%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) se mezcló con doxorubicina (DOX)/dimetilsulfóxido (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron gota a gota 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25 °C. Después de ser agitada durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS, para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco formada se tomó en medio volumen y se ajustó a pH 8,5, se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h antes de experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se diluyeron 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de GSH (10 mM) a una parte y se añadió un volumen igual de PBS puro a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis y se colocaron en un agitador termostático a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de GSH a la misma temperatura y la última se sumergió en 25 ml de PBS (20 mM) a la misma

temperatura; después de un período de tiempo dado, se tomaron 6 ml de dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de una solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

5 Determinación de la eficacia de introducción de fármaco de DOX en nanopartículas polímeras: se tomó una cierta cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas y sin reticular, y el agua en la solución se separó mediante un método de liofilización; seguidamente se le añadieron 0,5 ml de formamida y el sólido liofilizado se sometió a fusión completamente por ultrasonidos durante 1 h; se tomaron 20 ml de la solución resultante, a los que se añadieron 3 ml de formamida; después del ensayo de fluorescencia, se calcularon la eficacia de introducción de fármaco y el contenido de introducción de fármaco con referencia a una curva estándar de doxorubicina.

10 Eficacia de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso de doxorubicina en la alimentación) × 100%

Contenido de introducción del fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso total de las nanopartículas en blanco y doxorubicina en la alimentación) × 100%

15 Cuando el contenido de introducción de fármaco teórico es de 20%, la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas con HA-ornitina(OMe)-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%) respecto a doxorubicina fue de 79,57% y el contenido de introducción de fármaco real fue 15,56%.

20 Cuando el contenido de introducción del fármaco teórico es de 20%, la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-ornitina(OMe)-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%) respecto a doxorubicina fue de 81,2%, y el contenido de introducción de fármaco real fue 16,24%.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se desreticularon rápidamente en GSH 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente 81% de DOX en 22 h; mientras que las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX fueron muy estables en un entorno exento de GSH y se liberó poco de DOX, solamente un 16%.

25 Ejemplo 46. Introducción de fármaco anticancerígeno molecular pequeño doxorubicina (DOX) y su liberación activada por glutatión

30 Se mezcló una solución de HA-ornitina-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) con doxorubicina (DOX)/dimetilsulfóxido (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron gota a gota 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25 °C. Después de ser agitada durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS, para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

35 La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco formada se recogió en medio volumen y se ajustó a pH 8,5. Se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar.

40 Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se diluyeron 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de GSH (10 mM) a una parte y se añadió un volumen igual de PBS puro a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis y se colocaron en un agitador termostataado a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de GSH a la misma temperatura, y la última se sumergió en 25 ml de PBS (20 mM) a la misma temperatura; después de un período de tiempo dado, se tomaron 6 ml de dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de la solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

45 Determinación de la eficacia de introducción de fármaco de DOX en nanopartículas polímeras: se tomó una cierta cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas y sin reticular y el agua en la solución se separó mediante un método de liofilización; seguidamente se le añadieron 0,5 ml de formamida y el sólido liofilizado se sometió a fusión completamente por ultrasonidos durante 1 h; se tomaron 20 ml de la solución resultante, a los que se añadieron 3 ml de formamida; después del ensayo de fluorescencia, se calcularon la eficacia de introducción de fármaco y el contenido de introducción de fármaco con referencia a una curva estándar de doxorubicina.

50 Eficacia de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso de doxorubicina en la alimentación) × 100%

Contenido de introducción del fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso total de las nanopartículas en blanco y doxorubicina en la alimentación) × 100%

Cuando el contenido de introducción del fármaco teórico es de 20%, la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%) a doxorubicina fue de 81,5%, y el contenido de introducción de fármaco real fue de 16,38 %

5 Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se desreticularon rápidamente en GSH 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente un 82% de DOX en 22 h; mientras que las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX fueron muy estables en un entorno exento de GSH y se liberó poco de DOX, solamente 15%.

Ejemplo 47. Introducción de fármaco anticancerígeno molecular pequeño doxorubicina y su liberación accionada por glutatión

10 Una solución de HA-(aminohexilamino)-LA ($M_{nHa} = 400$ kDa, DS = 40%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) se mezcló con doxorubicina (DOX)/dimetilsulfóxido (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron gota a gota 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25°C. Después de agitar durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS, para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

15 La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco formada se recogió en medio volumen y se ajustó a pH 8,5. Se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) de 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar.

20 Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se diluyeron 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de GSH (10 mM) a una parte y se añadió un volumen igual de PBS puro a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis y se colocaron en un agitador termostatado a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de GSH a la misma temperatura y la última se sumergió en 25 ml de PBS (20 mM) a la misma temperatura; después de un período de tiempo dado, se tomaron 6 ml del dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de una solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

30 Determinación de la eficacia de introducción de fármaco de DOX en nanopartículas polímeras: se tomó una cierta cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco, reticuladas y sin reticular, y el agua en la solución se separó mediante un método de liofilización; seguidamente se le añadieron 0,5 ml de formamida y el sólido liofilizado se sometió a fusión completamente por ultrasonidos durante 1 h; se tomaron 20 ml de la solución resultante, a los que se añadieron 3 ml de formamida; después del ensayo de fluorescencia, se calcularon la eficacia de introducción de fármaco y el contenido de introducción del fármaco con referencia a una curva estándar de doxorubicina.

35 Eficacia de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso de doxorubicina en la alimentación) \times 100%

Contenido de introducción del fármaco = (peso de la doxorubicina introducida en nanopartículas/peso total de las nanopartículas en blanco y doxorubicina en la alimentación) \times 100%

40 Cuando el contenido de introducción de fármaco teórico es de 20%, la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-(aminohexilamino)-LA ($M_{nHa} = 400$ kDa, DS = 40%) respecto a doxorubicina fue de 79,8%, y el contenido de introducción de fármaco real fue de 15,96%.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se desreticularon rápidamente en GSH 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente un 83% de DOX en 22 h; mientras que las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX eran muy estables en un entorno exento de GSH, y se liberó poco de DOX, solamente 15%.

45 Ejemplo 48. Nanopartículas reticuladas de HA-(aminoetilamino)-LA ($M_{nHa} = 37$ kDa, DS = 28%) con contenido de DOX

50 Una solución de HA-(aminoetilamino)-LA ($M_{nHa} = 37$ kDa, DS = 28%)/formamida (5 mg/ml, 1 ml) se mezcló con doxorubicina (DOX)/dimetilsulfóxido (5 mg/ml, 0,25 ml) bajo agitación durante 1 h y se añadieron gota a gota 4 ml de PBS a la mezcla bajo agitación a 25°C. Después de ser agitada durante 1 h, la solución resultante se introdujo en una bolsa de diálisis previamente preparada (SPECTRA/POR, MWCO: 3500) y se dializó frente a PBS para formar una solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco.

55 La solución de nanopartículas polímeras con contenido de fármaco formada se tomó en medio volumen y se ajustó a pH 8,5. Se le añadieron 17,5 ml de 1,4-ditio-D,L-treobutanol (DTT) a 1 mg/ml después de permitir la entrada de gas nitrógeno durante 10 minutos; la solución mixta se agitó durante 24 h para experimentar una reacción a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. Las nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas se dializaron frente a PBS para separar el DTT sin reaccionar.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX fueron diluidas 100 veces con PBS (10 mM, pH 7,4) y se dividieron en dos partes: se añadió un volumen igual de PBS de GSH (10 mM) a una parte y se añadió un volumen igual de PBS puro a la otra parte a 37 °C. Estas soluciones se transfirieron inmediatamente a una bolsa de diálisis y se colocaron en un agitador termostataado a 37 °C (200 rpm). La primera se sumergió en 25 ml de PBS que tenía la misma concentración de GSH a la misma temperatura y la última se sumergió en 25 ml de PBS (20 mM) a la misma temperatura; después de un período de tiempo dado, se recogieron 6 ml de dializado fuera de la bolsa de diálisis para determinar su intensidad de fluorescencia y se añadieron 6 ml de solución de nueva aportación correspondiente al exterior de la bolsa de diálisis.

Determinación de la eficacia de introducción de fármaco de DOX en nanopartículas polímeras: se tomó una cierta cantidad de soluciones de nanopartículas con contenido de fármaco reticuladas y sin reticular y el agua en la solución se separó mediante un método de liofilización; seguidamente se le añadieron 0,5 ml de formamida y el sólido liofilizado se sometió a fusión completamente por ultrasonidos durante 1 h; se tomaron 20 ml de la solución resultante, a los que se añadieron 3 ml de formamida; después del ensayo de fluorescencia, se calcularon la eficacia de introducción de fármaco y el contenido de introducción de fármaco con referencia a una curva estándar de doxorubicina.

Eficacia de introducción de fármaco = (peso de doxorubicina introducida en nanopartículas/peso de doxorubicina en la alimentación) × 100%

Contenido de introducción de fármaco = (peso de la doxorubicina introducida en nanopartículas/peso total de las nanopartículas en blanco y doxorubicina en la alimentación) × 100%

Cuando el contenido de introducción del fármaco teórico es de 20%, la eficacia de introducción de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-(aminoetilamino)-LA ($M_{nHa} = 37$ kDa, DS = 28%) respecto a doxorubicina fue de 63,5% y el contenido de introducción de fármaco real fue de 12,7%.

Las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX se desreticularon rápidamente en GSH 10 mM a 37 °C y se liberó aproximadamente un 82% de DOX en 22 h; mientras que las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX fueron muy estables en un entorno exento de GSH y se liberó poco de DOX, solamente un 16%.

Determinación biológica

Ejemplo 49. Liberación de fármaco intracelular de nanopartículas reticuladas con contenido de DOX

Se usó microscopía exploración láser confocal para observar la endocitosis y comportamientos de liberación intracelular de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%, DLC = 12%) en células de cáncer de mama humano resistente a DOX (MCF-7/ADR) que expresó un alto nivel de receptores CD44 y tenía resistencia a DOX. Las células MCF-7/ADR se dispusieron primero en placas de cultivo celular a una densidad de 1×10^5 /pocillo y se cultivaron a 37°C con dióxido de carbono al 5% en 1 ml de medio que contenía 10% de suero, 100 UI/ml de penicilina antibiótica y 10 µg/ml de estreptomina durante 24 h para conseguir un cubrimiento monocapa de células de 70%. Seguidamente, se añadieron 200 µl de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX o solución exenta de DOX a cada pocillo, de modo que la concentración final de DOX en los pocillos era de 5 µg/ml. Después de una incubación a 37°C con dióxido de carbono al 5% durante 10 h, el medio se retiró y las suspensiones se lavaron con PBS por tres veces seguido de fijación con solución de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos y se lavaron con PBS tres veces. Seguidamente, el citoesqueleto se tiñó con péptidos de faloidina marcada con FITC y se lavó con PBS tres veces. Finalmente, el núcleo celular se tiñó con DAPI (dihidrocloreuro de 4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 15 minutos y se lavó con PBS tres veces. En un experimento de bloqueo de receptores, se incubaron soluciones de HA libres (5 mg/ml) con las células durante 4 h antes de la adición de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX, seguido de las etapas descritas anteriormente. La muestra preparada se observó y se fotografió mediante microscopía de exploración láser confocal.

La fig. 4 es una fotografía que muestra los resultados de liberación de fármaco de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de fármaco, DOX, y nanopartículas reticuladas encapsuladas en HA en células MCF-7/ADR (células de cáncer de mama humano) (I representa las nanopartículas con contenido de fármaco, II representa un fármaco libre y III representa nanopartículas con contenido de fármaco encapsuladas con un HA libre). Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX podrían ser rápidamente endocitosadas por células y liberar DOX en las células. Después de una incubación durante 10 h, casi la totalidad de la fluorescencia de DOX intracelular entró en el núcleo y la resistencia fue significativamente mayor que la de grupos testigos de DOX libre y los encapsulados con un HA libre, indicando que las nanopartículas tenían una propiedad significativa de dirección a diana y capacidad para invertir la resistencia a los fármacos de células tumorales.

Ejemplo 50. Medición de citotoxicidad de nanopartículas de HA-Lys-LA para MCF-7/ADR

Se midió la citotoxicidad de nanopartículas en blanco de HA-Lys-LA (sin introducción de fármaco alguno) ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 5%, 10%, 28%) para MCF-7/ADR mediante un método de MTT. En primer lugar, se dispusieron placas 100 µl de una suspensión 1640 de células (el medio 1640 contenía suero bovino fetal al 10%, 100 UI/ml de

penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células era 1×10^4 /pocillo y se colocaron a 37°C, dióxido de carbono al 5%, para realizar una incubación durante 24 h, de modo que el cubrimiento de las células monocapa fuera de 70 a 80%. Seguidamente se añadieron 20 µl de una solución de concentraciones diferentes de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA en PBS de forma que la concentración final de nanopartículas en blanco en los pocillos de células fuera de 0,5 o 1,0 mg/ml. Después de una incubación durante 24 h, se añadieron a cada pocillo 20 µl de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en PBS (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador para permitir que el MTT reaccionara con las células viables. Seguidamente se retiró el medio de cultivo que contenía MTT, se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazano color púrpura producidos por las células viables y MTT y se midió la absorbancia a 570 nm de cada pocillo usando un lector de microplacas (BioTek). Se obtuvo la viabilidad celular relativa comparando con la absorción a 570 nm de los pocillos testigos con solamente células en blanco. Los datos experimentales se obtuvieron a partir de cuatro grupos paralelos.

Viabilidad celular (%) = (muestra de OD 570/testigo de OD 570) × 100%

La actividad anticancerígena de nanopartículas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa; DS = 5%, 10%, 28%; DLC = 11%, 12%, 15%) se midió mediante un método similar al método anteriormente mencionado para medir la citotoxicidad de nanopartículas en blanco. Se dispusieron en placas 100 µL de una suspensión en 1640 de células MCF-7/ADR dispuestas en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células era de 1×10^4 /pocillo y se colocaron a 37 °C, 5% de carbono dióxido para realizar una incubación durante 24 h de forma que el cubrimiento de células monocapa fue de 70 a 80%. Seguidamente se añadieron 20 µl de solución de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA con contenido de DOX que tenían un grado diferente de sustitución de DOX libre en PBS a cada pocillo de forma que la concentración final de DOX en los pocillos de células fuera de 0,0023 a 150 µg/ml. Después de una incubación durante 4 h, se separó el medio original y se añadió la misma cantidad de medio de nueva aportación. Después de una incubación durante 44 h, se añadieron a cada pocillo 20 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador. El ensayo posterior y la medición de toxicidad fueron los mismos que se describieron anteriormente. En un experimento de bloqueo de receptores, la solución de HA libre (5 mg/ml) se incubó con células durante 4 h antes de la adición de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX, para completar el bloqueo de células tumorales por HA. Las etapas siguientes fueron las mismas que en lo que antecede, como grupos testigos.

La fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de la citotoxicidad de diferentes nanopartículas de HA-Lys-LA para células MCF-7/ADR. Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA tenían una buena biocompatibilidad y las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX tenían actividad antitumoral y tenían la actividad antitumoral más elevada cuando el grado de sustitución era de 10%, porque las nanopartículas reticuladas formadas no eran estables en caso de un grado de sustitución demasiado bajo y la modificación excesiva para el ácido hialurónico afectaría a su capacidad de dirección a diana.

Ejemplo 51. Medición de citotoxicidad de nanopartículas de HA-Lys-LA para MCF-7/ADR

Se midió la citotoxicidad de nanopartículas en blanco de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 40%) para MCF-7/ADR mediante un método de MTT. En primer lugar, se dispusieron en placas 100 µl de una suspensión en 1640 de células (el medio 1640 contenía suero bovino fetal al 10%, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) en una placa de cultivo de 96 pocillos con el fin de que la densidad final de células fuera 1×10^4 /pocillo y se colocaron a 37 °C, dióxido de carbono al 5%, para realizar una incubación durante 24 h, de forma que el cubrimiento de las células monocapa fue de 70 a 80%. Seguidamente se añadieron a cada pocillo 20 µl de solución de concentraciones diferentes de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA en PBS de forma que la concentración final de nanopartículas en blanco en los pocillos de células fuera de 0,5 o 1,0 mg/ml. Después de una incubación durante 24 h, se añadieron a cada pocillo 20 µl de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en PBS (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador para permitir que el MTT interaccionara con las células viables. Seguidamente se retiró el medio de cultivo que contenía MTT, se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazano color púrpura producidos por las células viables y MTT y se midió la absorbancia a 570 nm de cada pocillo usando un lector de microplacas (BioTek). Se obtuvo la viabilidad celular relativa comparando con la absorción a 570 nm de pocillos testigos con solo células en blanco. Los datos experimentales se obtuvieron a partir de cuatro grupos paralelos.

Viabilidad celular (%) = (muestra de OD 570/testigo de OD 570) × 100%

La actividad anticancerígena de las nanopartículas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa; DS = 40%; DLC = 20%) se midió mediante un método análogo al método anteriormente mencionado para medir la citotoxicidad de nanopartículas en blanco. Se dispusieron en placas 100 µl de una suspensión en 1640 de células MCF-7/ADR en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células fuera de 1×10^4 /pocillo y se colocaron a 37°C, 5% de carbono dióxido, para realizar una incubación durante 24 h de forma que el cubrimiento de las células monocapa fuera de 70 a 80%. Seguidamente se añadieron a cada pocillo 20 µl de una solución de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA con contenido de DOX que tenían un grado diferente de sustitución de DOX libre en PBS de forma que la concentración final de DOX en los pocillos de células fuera de 0,0023 a 150 µg/ml. Después de una incubación durante 4 h, se retiró el medio original y se añadió la misma

cantidad de medio de nueva aportación. Después de una incubación durante 44 h, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de una solución de MTT (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador. El ensayo posterior y la medición de la toxicidad fueron los mismos que se describieron anteriormente. En un experimento de bloqueo de receptores, la solución de HA libre (5 mg/ml) se incubó con células durante 4 h antes de la adición de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX, para completar el bloqueo de células tumorales por HA. Las siguientes etapas fueron las mismas que anteriormente, como grupos testigos.

Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA en blanco tenían una buena biocompatibilidad, y las nanopartículas reticuladas con contenido de DOX tenían cierta actividad antitumoral.

Ejemplo 52. Medición de citotoxicidad para glioma humano (U87MG)

Se midió la citotoxicidad de nanopartículas en blanco de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 5%, 10%, 28%) para células U87MG mediante un método de MTT. En primer lugar, se dispusieron en placas 100 μ l de un medio de glucosa bajo DMEM de células (el medio de glucosa DMEM bajo contenía 10% de suero bovino fetal, 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina) en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células fuera 1×10^4 /pocillo y se colocaron a 37 °C, 5% de dióxido de carbono para realizar una incubación durante 24 h de forma que el cubrimiento de las células monocapa fuera de 70 a 80%. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de solución de diferentes concentraciones de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA en PBS de forma que la concentración final de nanopartículas en blanco en los pocillos de células fuera de 0,5 o 1,0 mg/ml. Después de una incubación durante 24 h, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en PBS (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador para permitir que el MTT interaccionara con células viables. Seguidamente se separó el medio de cultivo que contenía MTT, se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales de formazano de color púrpura producidos por células viables y MTT y se midió la absorbancia a 570 nm de cada pocillo usando un lector de microplacas (BioTek). La viabilidad celular relativa se obtuvo comparando con la absorción a 570 nm de los pocillos testigos con solamente células en blanco. Los datos experimentales se obtuvieron a partir de cuatro grupos paralelos.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = (\text{muestra de OD 570/testigo de OD 570}) \times 100\%$$

La actividad anticancerígena de nanopartículas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa; DS = 5%, 10%, 28%; DLC = 11%, 12%, 15%) se midió mediante un método análogo al método anteriormente mencionado para medir la citotoxicidad de nanopartículas en blanco. 100 μ l de un medio de glucosa bajo en DMEM de células U87MG se dispuso en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células fuera de 1×10^4 /pocillo, y se colocaron a 37 °C, 5% dióxido de carbono, para realizar una incubación durante 24 h para que el cubrimiento de las células monocapa sea de 70 a 80%. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de solución de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA con contenido de DOX que tenían un diferente grado de sustitución o DOX libre en PBS, de forma que la concentración final de DOX en los pocillos de células fuera de 0,0023 a 150 μ g/ml. Después de una incubación durante 4 h, se separó el medio original y se añadió la misma cantidad de medio de nueva aportación. Después de una incubación durante 44 h, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de una solución de MTT (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador. El ensayo posterior y la medición de la toxicidad fueron los mismos anteriormente descritos. En el experimento de bloqueo de receptores, se incubó la solución de HA libre (5 mg/ml) con células durante 4 h antes de la adición de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX, para completar el bloqueo de células tumorales por HA. Las siguientes etapas fueron las mismas que anteriormente.

Como se muestra mediante los resultados, la viabilidad celular de nanopartículas en blanco en las células U87MG después de 48 h fue de más de 90%, lo que indicó que la biocompatibilidad de las nanopartículas en blanco era buena. Las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX tenían una actividad antitumoral en células U87MG con una baja expresión de receptor CD44, pero las nanopartículas con contenido de fármaco que tenían grados diferentes de sustitución tenían una actividad antitumoral parecida, que era bastante inferior a la del fármaco libre.

Ejemplo 52. Medición de citotoxicidad para glioma humano (U87MG)

Se midió la citotoxicidad de nanopartículas en blanco de HA-Lys-LA ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 40%) para células U87MG mediante un método de MTT. En primer lugar, se dispusieron en placas 100 μ l de un medio de glucosa bajo en DMEM de células (el medio de glucosa bajo en DMEM contenía 10% de suero bovino fetal, 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina) en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células era 1×10^4 /pocillo, y se colocaron a 37°C, 5% de dióxido de carbono para realizar una incubación durante 24 h, de forma que el cubrimiento de células monocapa fuera de 70 a 80%. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 20 μ l de solución de concentraciones diferentes de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA en PBS de forma que la concentración final de nanopartículas en blanco en los pocillos de células fuera de 0,5 o 1,0 mg/ml. Después de una incubación durante 24 h, se añadieron 20 μ l de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en PBS (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador para permitir que el MTT interaccionara con células viables. Seguidamente se separó el medio de cultivo que contenía MTT, se añadieron a

cada pocillo 150 µl de DMSO para disolver los cristales de formazano color púrpura producidos por células viables y MTT y se midió la absorbancia a 570 nm de cada pocillo usando un lector de microplacas (BioTek). La viabilidad celular relativa se obtuvo comparando con la absorción a 570 nm de pocillos testigos con solamente células en blanco. Los datos experimentales se obtuvieron a partir de cuatro grupos paralelos.

5 Viabilidad celular (%) = (muestra de OD 570/testigo de OD 570) × 100%

La actividad anticancerígena de las nanopartículas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 40%, DLC = 20%) se midió mediante un método análogo al método anteriormente mencionado para medir la citotoxicidad de nanopartículas en blanco. Se dispusieron en placas 100 µl de un medio de glucosa bajo en DMEM de células U87MG en una placa de cultivo de 96 pocillos de forma que la densidad final de las células fuera de 1×10^4 /pocillo y se colocaron a 37 °C, 5% dióxido de carbono, para realizar una incubación durante 24 h de forma que el cubrimiento de células monocapa fuera de 70 a 80%. Seguidamente, se añadieron a cada pocillo 20 µl de solución de nanopartículas reticuladas o sin reticular de HA-Lys-LA con contenido de DOX que tenían un grado diferente de sustitución de DOX libre en PBS, de forma que la concentración final de DOX en los pocillos de células fuera de 0,0023 a 150 µg/ml. Después de una incubación durante 4 h, el medio original se separó y se añadió la misma cantidad de medio de nueva aportación. Después de una incubación durante 44 h, se añadieron a cada pocillo 20 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) y se incubó durante 4 h en un incubador. El ensayo posterior y la medición de toxicidad fueron los mismos que se describieron anteriormente. En un experimento de bloqueo de receptores, la solución de HA libre (5 mg/ml) se incubó con células durante 4 h antes de la adición de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX, para completar el bloqueo de células tumorales por HA. Las siguientes etapas fueron las mismas que anteriormente.

Como se muestra mediante los resultados, la viabilidad celular de las nanopartículas en blanco en células U87MG después de 48 h fue de más de 88%, lo que indicó que la biocompatibilidad de nanopartículas en blanco era buena. Las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX tenían una actividad antitumoral en células U87MG con baja expresión de receptor CD44, pero las nanopartículas con contenido de fármaco que tenían diferentes grados de sustitución tenían una actividad antitumoral parecida, que era bastante inferior a la del fármaco libre.

Ejemplo 54. Estudio de circulación de nanopartículas reticuladas HA-Lys-LA con contenido de DOX en el cuerpo de ratones

Las siguientes operaciones de ensayos en animales se llevaron a cabo bajo protocolos aprobados por la entidad Soochow University Laboratory Animal Center. Seis ratones desprovistos de inmunidad de aproximadamente 5-8 semanas de edad, que pesaban 18-22 g se dividieron aleatoriamente en dos grupos, y a cada grupo se le administraron nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%, DLC = 12%) o DOX libre (siendo la dosificación de DOX de 15 mg/kg) a través de la inyección en una vena de la cola. Se extrajeron 10 µl de sangre de una vena de la cola cada vez en valores diferentes de tiempo después de la inyección para 2 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h. Después de que se retiró la sangre, la muestra de sangre se pesó y se disolvió en 100 µl de solución de Triton al 1%, y seguidamente se le añadió 1 ml de solución en isopropanol de ácido clorhídrico a 0,75 mol/l. La mezcla se dejó en reposo durante una noche en la oscuridad a -20 °C. Después de una centrifugación, la materia sobrenadante fue sometida a un ensayo de fluorescencia.

40 % ID/g = (muestra FL × (V Triton + V ácido clorhídrico))/(M sangre × FL estándar × V estándar × factor de dilución estándar) × 100%

La fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados de la circulación sanguínea de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%, DLC = 12%) en ratones. Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX tenían una buena estabilidad y pudieron conseguir una circulación prolongada en ratones, mientras que el DOX libre casi no fue detectado en la sangre de ratones después de 2 h.

Ejemplo 55. Estudio de la circulación de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX en la sangre de ratones

Las siguientes operaciones de ensayo en animales se llevaron a cabo bajo protocolos aprobados por la entidad Soochow University Laboratory Animal Center. Seis ratones desprovistos de inmunidad de aproximadamente 5-8 semanas de edad, que pesaban 18-22 g, se dividieron aleatoriamente en dos grupos y a cada grupo se administró nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 40%, DLC = 20%) o DOX libre (siendo la dosificación de DOX de 15 mg/kg) a través de inyección en una vena de la cola. Se extrajeron 10 µl de sangre de una vena de la cola cada vez en valores de tiempo diferentes después de la inyección para 2 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h. Después de que se retiró la sangre, la muestra de sangre se pesó y se disolvió en 100 µl de solución de Triton al 1%, y seguidamente se le añadió 1 ml de solución en isopropanol de ácido clorhídrico a 0,75 mol/l. La mezcla se dejó en reposo durante una noche en la oscuridad a -20 °C. Después de una centrifugación, la materia sobrenadante se sometió a un ensayo de fluorescencia.

$\% \text{ ID/g} = (\text{muestra FL} \times (\text{V Triton} + \text{V ácido clorhídrico})) / (\text{M sangre} \times \text{FL estándar} \times \text{V estándar} \times \text{factor de dilución estándar}) \times 100\%$

5 Como muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{n\text{Ha}} = 35 \text{ kDa}$, $\text{DS} = 40\%$, $\text{DLC} = 20\%$) tenían buena estabilidad y pudieron conseguir una circulación prolongada en ratones, mientras que el DOX libre casi no se detectó en la sangre de ratones después de 2 h.

Ejemplo 56. Formación de imágenes *in vivo* de ratones desprovistos de inmunidad que portan un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos tratado con nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA

10 La distribución de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA ($M_{n\text{Ha}} = 35 \text{ kDa}$, $\text{DS} = 10\%$) en partes respectivas se observó en tiempo real usando un sistema de formación de imágenes *in vivo* Maestro durante la circulación *in vivo*. Se estableció un modelo de xenoinjerto de ratones desprovistos de inmunidad que portan un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos mediante la inoculación subcutánea de 1×10^7 MCF-7/ADR en el lado trasero de cada ratón desprovisto de inmunidad (que pesaba de 18 a 22 g). Cuando el tamaño de los tumores alcanzó 100 mm^3 , los ratones desprovistos de inmunidad que portaban tumores fueron inyectados con 0,2 ml de una solución de nanopartícula reticulada de HA-Lys-LA con contenido de molécula fluorescente Cy7 a través de una vena de la cola. 15 Seguidamente, los ratones desprovistos de inmunidad fueron anestesiados en un cierto punto de tiempo y se fijaron a una placa de plástico negra, se colocaron en un sistema de obtención de imágenes *in vivo* Maestro y se midió la intensidad de la distribución de Cy7 *in vivo* a una longitud de onda de emisión de 720 nm.

20 La fig. 7 es una fotografía que muestra resultados de formación de imágenes *in vivo* de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de Cy7 en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores. Como muestra mediante los resultados, la intensidad de la fluorescencia de Cy7 en ratones desprovistos de inmunidad aumentó con la prolongación del tiempo y la intensidad de fluorescencia en los sitios de tumor alcanzó un valor más elevado a 10 h, y la fluorescencia de Cy7 en los sitios de tumor era todavía elevada después de 24 h, indicando que Las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA se podrían enriquecer eficazmente en los sitios de tumor y mantenerse un tiempo prolongado.

25 Ejemplo 57. Formación de imágenes *ex vivo* de órganos de ratones desprovistos de inmunidad que portan un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos tratado con nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX

30 Seis ratones desprovistos de inmunidad que portaban un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos con un tamaño de tumor de 100 mm^3 se dividieron aleatoriamente en dos grupos, y a cada ratón se administró por vía intravenosa en una vena de la cola 0,2 ml de (1) nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{n\text{Ha}} = 35 \text{ kDa}$, $\text{DS} = 10\%$, $\text{DLC} = 12\%$); (2) una solución de DOX libre (una concentración de DOX final de aproximadamente 15 mg/kg). Después de 10 h, se extirparon el corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón y bloque de tumor, se lavaron y fijaron en una placa de plástico negra, que seguidamente se colocó en un sistema de formación de imágenes *in vivo* Maestro y se midió la intensidad de la distribución de DOX *in vivo* a una longitud de onda de 35 emisión de 523 nm.

Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{n\text{Ha}} = 35 \text{ kDa}$, $\text{DS} = 10\%$, $\text{DLC} = 12\%$) se concentraron en el sitio del tumor más que en otros órganos y liberaron una elevada fluorescencia de DOX, mientras que el DOX libre casi no se concentró en el sitio del tumor.

40 Ejemplo 58. Biodistribución de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX en órganos de ratones desprovistos de inmunidad que portan un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos

45 Seis ratones desprovistos de inmunidad que portaban tumores con un tamaño de tumor de 100 mm^3 se dividieron aleatoriamente en dos grupos y cada ratón se le administró por vía intravenosa a través de una vena de la cola 0,2 ml de (1) Nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{n\text{Ha}} = 35 \text{ kDa}$, $\text{DS} = 10\%$, $\text{DL} = 12\%$); (2) una solución de DOX libre (una concentración de DOX final de aproximadamente 15 mg/kg). Después de 10 h, se extirparon el corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón y bloque de tumor, se lavaron, se pesaron y seguidamente se les añadieron $400 \mu\text{l}$ de Triton al 1%; la materia resultante se homogeneizó con un homogeneizador y seguidamente se le añadieron $600 \mu\text{l}$ de solución en isopropanol de ácido clorhídrico a $0,75 \text{ mol/l}$. La mezcla se colocó en un refrigerador a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Después de 24 h, la mezcla se sometió a centrifugación y la materia sobrenadante se sometió a un ensayo de fluorescencia.

50 $\% \text{ ID/g} = (\text{FL órgano} \times (\text{V solución de tratamiento} + \text{V órgano})) / (\text{V fármaco} \times \text{factor de dilución} \times \text{FL fármaco} \times \text{M órgano}) \times 100\%$

55 La fig. 8 es un gráfico que muestra resultados de la biodistribución de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX ($M_{n\text{Ha}} = 35 \text{ kDa}$, $\text{DS} = 10\%$, $\text{DLC} = 12\%$) en órganos de ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores. Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX tienen un enriquecimiento elevado de $12,71\% \text{ ID/g}$ en el sitio del tumor, mientras que se concentró poco DOX libre en el sitio del tumor, saladamente $0,63\% \text{ ID/g}$. Después de una inyección intravenosa a través de una vena de la cola de nanopartículas de oro huecas con contenido de doxorubicina (DOX) existentes con

la superficie modificada con polietilenglicol (PEG) durante 6 horas y 24 h, la concentración de DOX en el sitio del tumor era menor que 5% ID/g, lo que indica que el vehículo de fármaco basado en polímero anfílico de ácido hialurónico de la presente invención puede entrar eficazmente en las células tumorales sin modificar la molécula diana, y la relación de enriquecimiento en el sitio del tumor es elevada.

- 5 Ejemplo 59. Efecto antitumoral de nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX en ratones desprovistos de inmunidad que portan un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos

Ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores con un tamaño de tumor de 50 mm³ se dividieron aleatoriamente en tres grupos (seis en cada grupo) y este día se ajustó como día 0. A cada ratón se le administró por vía intravenosa en una vena de la cola 0,2 ml de (1) nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 10%, DLC = 12%); (2) una solución de DOX libre; (3) PBS (una concentración de DOX final de aproximadamente 7,5 mg/kg). Los efectos de micelas con contenido de fármaco sobre el crecimiento tumoral en ratones desprovistos de inmunidad se midieron regularmente con un calibrador. Los cambios del peso corporal de los ratones desprovistos de inmunidad se pesaron regularmente con una balanza. El tamaño del tumor se obtuvo basándose en una fórmula $V = 0,5 \times L \times W \times H$ (L es la longitud de los puntos más largos del tumor; W es la longitud de los puntos más cortos del tumor; H es la altura del tumor). Después de 24 días, se tomó un ratón aleatoriamente de cada grupo y se sacrificó mediante dislocación del cuello y la médula espinal, y se extirparon el corazón, el hígado y el tumor de cada ratón y se fijaron con formaldehído al 4%, se cortaron en láminas y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se sometieron a un análisis histológico. Se siguieron observando los restantes ratones desprovistos de inmunidad. Se consideró que los ratones estaban muertos cuando los ratones desprovistos de inmunidad murieron durante el tratamiento o el volumen del tumor sobrepasó 1.000 mm³.

Volumen tumoral relativo (%) = volumen de tumor/volumen de tumor en el día 0 × 100%.

Cambio de peso relativo (%) = peso corporal de ratón desprovisto de inmunidad/peso corporal de ratón desprovisto de inmunidad en el día 0 × 100%.

La fig. 9 es un gráfico que muestra los resultados de los cambios del crecimiento tumoral en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores tratados con nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 10%, DLC = 12%). como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX pudieron inhibir eficazmente el crecimiento del volumen del tumor y tenían una actividad antitumoral elevada, mientras que el DOX libre no pudo inhibir el crecimiento tumoral. Los cambios en el peso corporal de ratones desprovistos de inmunidad y el experimento de supervivencia mostraron que las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 10%, DLC = 12%) no tuvieron efecto sobre el peso corporal, tuvieron menos efectos secundarios y dieron lugar a un tiempo de supervivencia más prolongado, mientras que el DOX libre redujo el peso corporal de los ratones desprovistos de inmunidad en un 28%, tuvo grandes efectos secundarios y provocó que todos los ratones murieran en 28 días. Aparte de esto, como muestra mediante los resultados del análisis histológico de tinción de H&E, un tejido de tumor correspondiente a las nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX (M_{nHa} = 35 kDa, DS = 10%, DLC = 12%) tuvo un área grande de necrosis, pero tanto el corazón y el hígado eran normales; mientras que los tejidos tumorales correspondientes a los grupos de DOX libre y PBS crecieron vigorosamente y el hígado correspondiente al grupo de DOX libre estaba grandemente deteriorado y las células del miocardio atrofiadas y aparecieron vacuolos, acompañados de infiltración de tejido inflamatorio.

- 40 Ejemplo 60. Efecto del crecimiento tumoral de nanopartículas reticuladas HA-ornitina-LA con contenido de DOX (M_{nHa} = 100 kDa, DS = 28%) en ratones desprovistos de inmunidad que portaban tumor LP1 (mieloma múltiple)

Ratones desprovistos de sistema inmune que portan tumores con un tamaño de tumor de 50 mm³ se dividieron aleatoriamente en tres grupos (seis en cada grupo) y este día se ajustó como día 0. A cada ratón se le administró por vía intravenosa a través de una vena de la cola 0,2 ml de (1) nanopartículas reticuladas de HA-Lys-LA con contenido de DOX (M_{nHa} = 100 kDa, DS = 28%, DLC = 12%); (2) una solución de DOX libre; (3) PBS (una concentración de DOX final de aproximadamente 7,5 mg/kg). Los efectos de micelas con contenido de fármaco sobre el crecimiento tumoral en ratones desprovistos de inmunidad se midieron regularmente con un calibrador. Los cambios en el peso corporal de ratones desprovistos de inmunidad se pesaron regularmente con una balanza. El tamaño del tumor se obtuvo basándose en una fórmula $V = 0,5 \times L \times W \times H$ (L es la longitud de los puntos más largos del tumor; W es la longitud de los puntos más cortos del tumor; H es la altura del tumor). Después de 24 días, se tomó aleatoriamente un ratón de cada grupo y se sacrificó mediante dislocación del cuello y la médula espinal y extirparon el corazón, el hígado y el tumor de cada ratón y se fijaron con formaldehído al 4%, se cortaron en láminas y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se sometieron a un análisis histológico. Se siguieron observando los ratones desprovistos de inmunidad restantes. Se consideró que los ratones murieron cuando el ratón desprovisto de inmunidad murió durante el tratamiento o el volumen tumoral sobrepasó los 1.000 mm³.

Volumen tumoral relativo (%) = volumen de tumor/volumen de tumor en el día 0 × 100%.

Cambio de peso relativo (%) = peso corporal de ratones desprovistos de inmunidad/peso corporal de ratones desprovistos de inmunidad en el día 0 × 100%.

Las figs. 13A a 13D muestran los resultados de los cambios de crecimiento tumoral en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores tratados con nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 100$ kDa, DS = 28%, DLC = 12%). La fig. 13A muestra los resultados del cambio de volumen de tumor relativos. A partir de la fig. 13A, se puede observar que en ratones tratados con nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX, un 2/5 de los tumores desapareció básicamente en 25 días. A partir de la fig. 13B, se puede observar que, en comparación con ratones tratados con PBS, el volumen del tumor en ratones tratados con nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX disminuyó significativamente. La fig. 13C muestra un cambio relativo en el peso corporal de ratones desprovistos de inmunidad. Considerando la fig. 13C, el fármaco libre provocaría una gran disminución en el peso corporal de los ratones, mientras que los ratones tratados con nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX tuvieron un cambio relativamente menor en el peso corporal. Considerando las figs. 13A y 13B, las nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX aumentaron la actividad antitumoral de los ratones, al mismo tiempo que tenían una menor toxicidad para los ratones. La fig. 13D muestra una tasa de supervivencia de los ratones. Como se muestra mediante los resultados de las figs. 13A a D, las nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX pudieron inhibir eficazmente el crecimiento del volumen tumoral y tuvieron una elevada actividad antitumoral, mientras que el DOX libre no pudo inhibir el crecimiento tumoral. Los cambios en el peso corporal de los ratones desprovistos de inmunidad y el experimento de supervivencia mostraron que las nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 100$ kDa, DS = 28%, DLC = 12%) no tuvieron efecto sobre el peso corporal, tuvieron menos efectos secundarios y dieron lugar al tiempo de supervivencia más prolongado, mientras que el DOX libre redujo el peso corporal de los ratones desprovistos de inmunidad en aproximadamente un 34%, tuvo grandes efectos secundarios y provocó que todos los ratones murieran en 15 días. Aparte de esto, como lo muestra mediante los resultados del análisis histológico de tinción de H&E, un tejido tumoral correspondiente a las nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 100$ kDa, DS = 28%, DLC = 12%) tenía un área grande de necrosis, pero el corazón y el hígado estaban ambos normales; mientras que los tejidos tumorales correspondientes a los grupos de DOX libre y PBS crecieron vigorosamente y el hígado correspondiente al grupo de DOX libre estaba grandemente deteriorado, las células del miocardio atrofiadas y aparecieron vacuolos, acompañados de infiltración tejidos inflamatorios.

Ejemplo 61. Estudio de circulación de nanopartículas reticuladas HA-éster metílico de ornitina-LA con contenido de DOX en el cuerpo de ratones

Las siguientes operaciones de ensayo en animales se llevaron a cabo bajo protocolos aprobados por la entidad Soochow University Laboratory Animal Center. Seis ratones desprovistos de inmunidad de aproximadamente 5-8 semanas de edad, que pesaban 18-22 g, se dividieron aleatoriamente en dos grupos y a cada grupo se le administró nanopartículas reticuladas de HA-éster metílico de ornitina-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%, DLC = 12%) o DOX libre (siendo la dosificación de DOX de 15 mg/kg) a través de inyección en una vena de la cola. Se extrajeron 10 μ l de sangre de la cola cada vez en valores de tiempo diferentes después de la inyección para 2 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 hs, 12 hs, 24 h. Después de que se extrajo la sangre, la muestra de sangre se pesó y se disolvió en 100 μ l de una solución de Triton al 1% y seguidamente se le añadió 1 ml de una solución en isopropanol de ácido clorhídrico a 0,75 mol/l. La mezcla se dejó en reposo durante una noche en oscuridad a -20 °C. Después de la centrifugación, la materia sobrenadante se sometió a un ensayo de fluorescencia.

$\% \text{ ID/g} = (\text{FL muestra} \times (\text{V Tritón} + \text{V ácido clorhídrico})) / (\text{M sangre} \times \text{FL estándar} \times \text{V estándar} \times \text{factor de dilución estándar}) \times 100\%$

La fig. 14 es un gráfico que muestra los resultados de la circulación de sangre de nanopartículas reticuladas de HA-éster metílico de ornitina-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 28%, DLC = 12%) y DOX en ratones. Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-éster metílico de ornitina-LA con contenido de DOX tenían una buena estabilidad y pudieron conseguir una circulación prolongada en ratones, mientras que el DOX libre casi no se detectó en la sangre de ratones después de 2 h.

Ejemplo 62. Biodistribución de nanopartículas reticuladas HA-(aminohexilamino)-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 400$ kDa, DS = 40%) en órganos de ratones desprovistos de inmunidad que portan un tumor de cáncer de mama resistente a fármacos

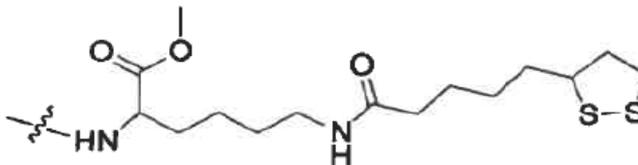
Seis ratones desprovistos de inmunidad que portaban tumores con un tamaño de tumor de 100 mm³ se dividieron aleatoriamente en dos grupos, y a cada ratón desprovisto de inmunidad se le administró por vía intravenosa a través de una vena de la cola 0,2 ml de (1) nanopartículas reticuladas de HA-(aminohexilamino)-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 400$ kDa, DS = 40%, DLC = 12%); (2) una solución de DOX libre (una concentración de DOX final de aproximadamente 15 mg/kg). Después de 10 h, se extirparon el corazón, hígado, bazo, pulmón, riñón y el bloque de tumor, se lavaron, se pesaron y seguidamente se les añadieron 400 μ l de Triton al 1%; materia resultante se homogeneizó con un homogeneizador y seguidamente se le añadieron 600 μ l de una solución en isopropanol de ácido clorhídrico a 0,75 mol/l. La mezcla se colocó en un refrigerador a -20 °C. Después de 24 h, la mezcla se sometió a centrifugación y la materia sobrenadante se sometió a un ensayo de fluorescencia.

$\% \text{ ID/g} = (\text{órgano FL} \times (\text{V solución de tratamiento} + \text{V órgano})) / (\text{V fármaco} \times \text{factor de dilución} \times \text{FL fármaco} \times \text{M órgano}) \times 100\%$

La fig. 15 es un gráfico que muestra los resultados de la biodistribución de nanopartículas reticuladas de HA-(aminohexilamino)-LA con contenido de DOX ($M_{nHa} = 35$ kDa, DS = 10%, DLC = 12%) en órganos de ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores. Como se muestra mediante los resultados, las nanopartículas reticuladas de HA-(aminohexilamino)-LA con contenido de DOX tienen un enriquecimiento elevado de 15,3% ID/g en el sitio del tumor, mientras que un poco de DOX libre se concentró en el sitio del tumor, solamente 0,63% ID/g. Después de una inyección intravenosa a través de una vena de la cola de nanopartículas de oro huecas con contenido de doxorubicina (DOX) existentes con la superficie modificada con polietilenglicol (PEG) durante 6 h y 24 h, la concentración de DOX en el sitio del tumor era de menos de 5% ID/g, lo que indica que el vehículo del fármaco basado en el polímero anfílico de ácido hialurónico de la presente invención puede entrar efectivamente en las células tumorales sin modificar la molécula diana, y la relación de enriquecimiento en el sitio del tumor es elevada.

REIVINDICACIONES

1. Un polímero anfifílico basado en ácido hialurónico en el que la cadena principal es ácido hialurónico y una cadena secundaria es éster metílico de lisina-lipoilo, teniendo la cadena lateral una fórmula estructural como sigue:



- 5 el ácido hialurónico tiene un peso molecular de 7 a 500 kDa; el grado de sustitución de la cadena lateral es de 5 a 40%.
2. Un método para preparar el polímero anfifílico basado en ácido hialurónico según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:
- 10 en primer lugar, bajo la catálisis de hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida/N-hidroxisuccinimida, un ácido hialurónico reacciona con éster metílico de N-terc-butoxicarbonil-lisina a través de una reacción de amidación para obtener ácido hialurónico-éster metílico de N-terc-butoxicarbonil-lisina, seguido de desprotección, para obtener ácido hialurónico-éster metílico de lisina; el ácido hialurónico-éster metílico de lisina reacciona con anhídrido de ácido lipoico a través de una reacción de amidación bajo catálisis de 4-(dimetilamino)-piridina, para obtener un polímero anfifílico basado en ácido hialurónico.
- 15 3. Una nanopartícula reticulada, en que la nanopartícula reticulada está compuesta por el polímero anfifílico según la reivindicación 1, la capa hidrófila externa de la nanopartícula reticulada está compuesta por ácido hialurónico y la capa hidrófoba interna de la nanopartícula reticulada está compuesta por anillos de cinco miembros reticulados de éster metílico de lisina-lipoilo.
4. El polímero anfifílico según la reivindicación 1, para ser usado en la preparación de vehículos de fármacos.
- 20 5. Una nanopartícula con contenido de fármaco, que comprende un vehículo y un fármaco anticancerígeno molecular pequeño introducido en el vehículo, en que dicho vehículo está compuesto por el polímero anfifílico según la reivindicación 1, una capa hidrófila externa de dicho vehículo está compuesta por ácido hialurónico y una capa hidrófoba interna de dicho vehículo está compuesta por anillos de cinco miembros reticulados de éster metílico de lisina-lipoilo.
- 25 6. La nanopartícula con contenido de fármaco según la reivindicación 5, en que el fármaco anticancerígeno molecular pequeño es doxorubicina, paclitaxel, curcumina, docetaxel, o camptotecina.
7. La nanopartícula con contenido de fármaco según la reivindicación 5, en que la eficacia de introducción del fármaco del vehículo para un fármaco es de 40% a 91% y un contenido de introducción de fármaco de las nanopartículas con contenido de fármaco es de 11% a 22%.
- 30 8. La nanopartícula con contenido de fármaco según la reivindicación 5, en la que el tamaño de partículas de las nanopartículas con contenido de fármaco es de 50-300 nm y la distribución del tamaño de partículas es de 0,02-0,30.
9. La nanopartícula con contenido de fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para ser usada en la preparación de un fármaco antitumoral.
- 35 10. La nanopartícula con contenido de fármaco según la reivindicación 9, en la que el tumor es un tumor en el que son sobreexpresados receptores CD44.

FIG 1

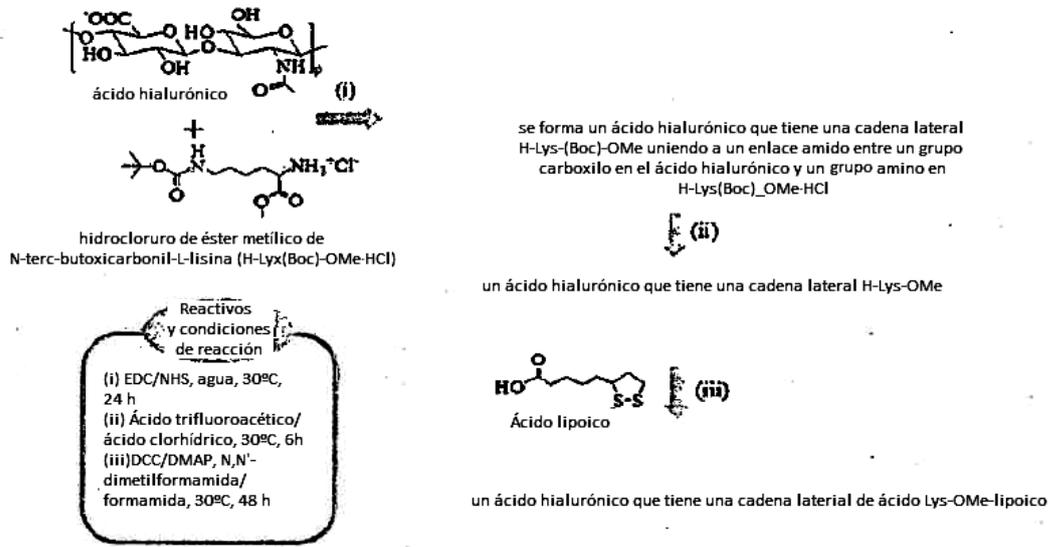


FIG 2

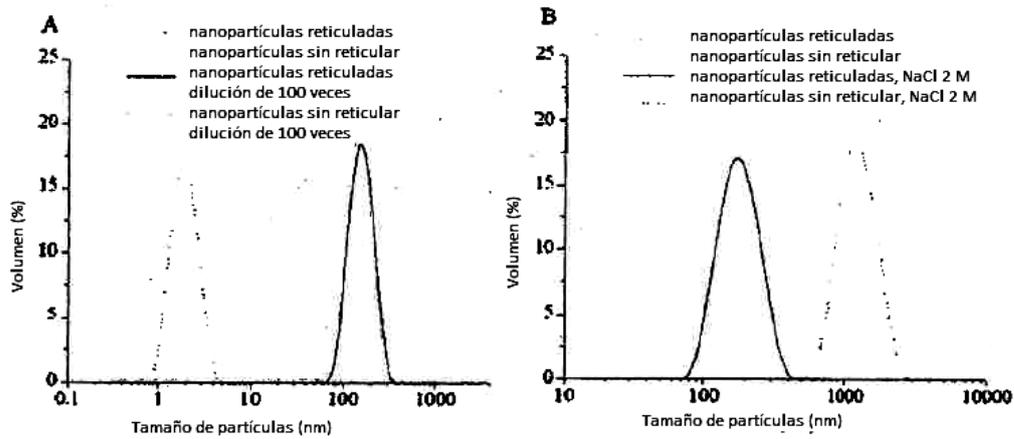


FIG 3

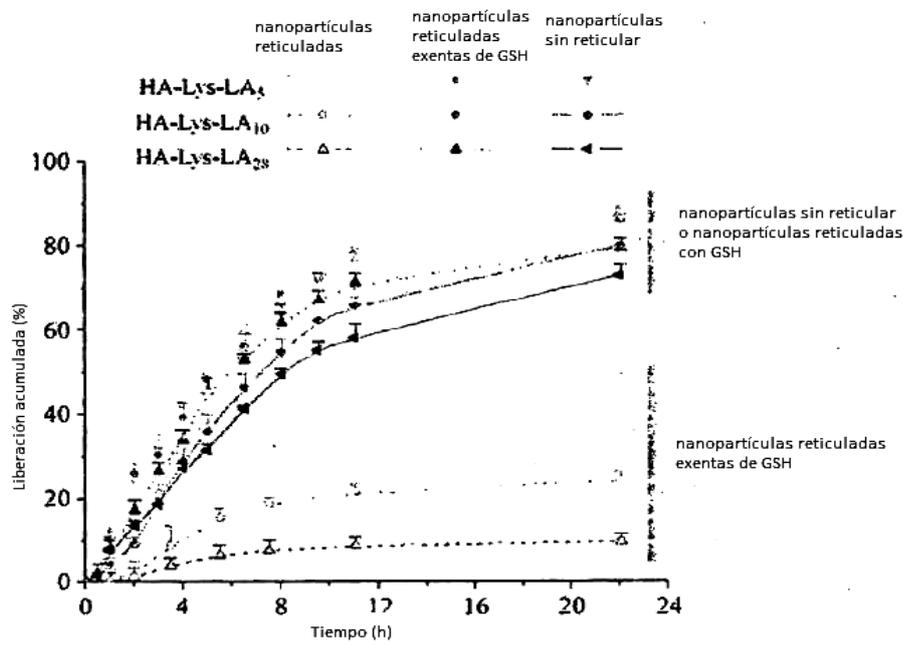


FIG 4

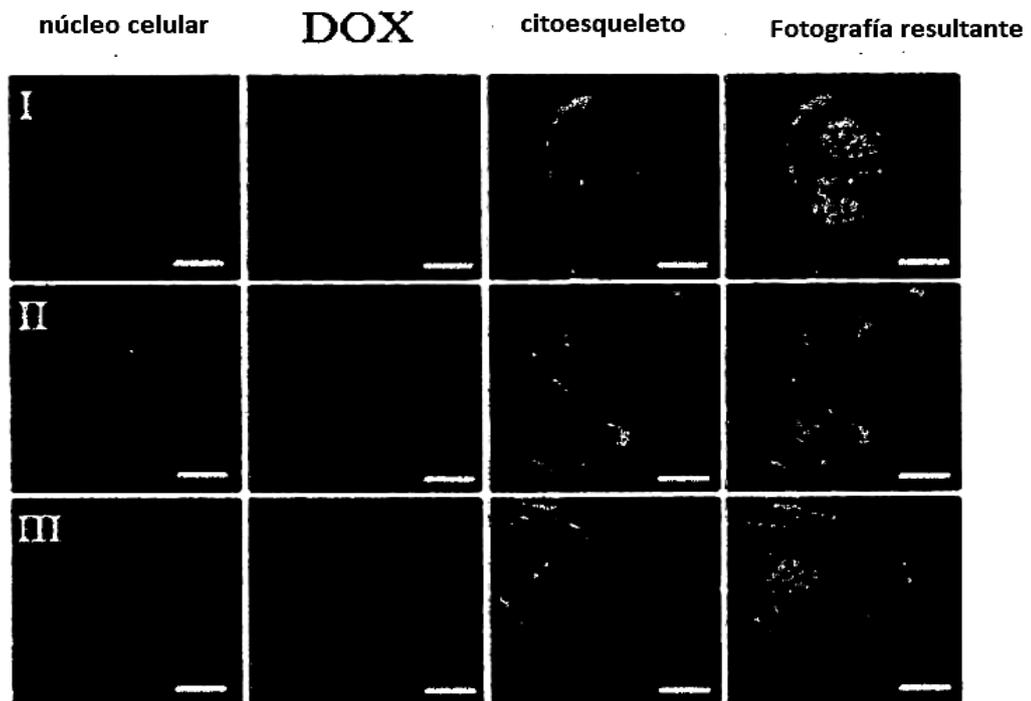


FIG. 5

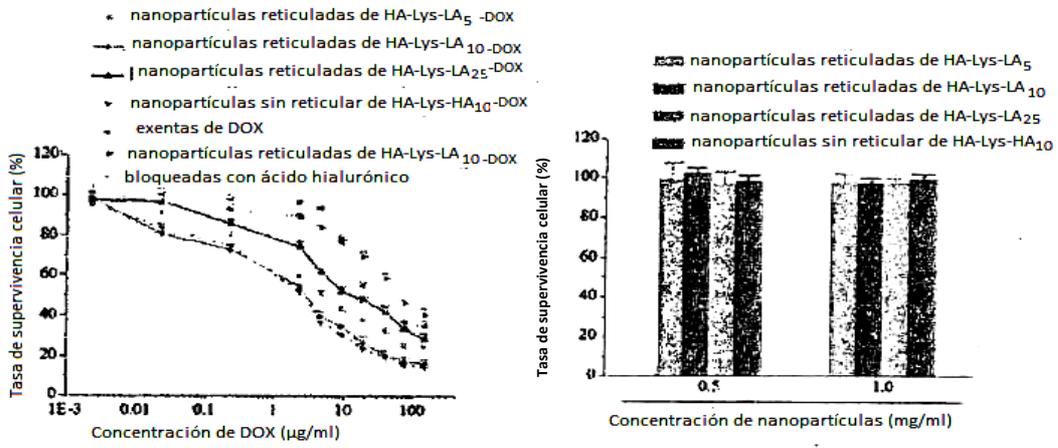


FIG. 6

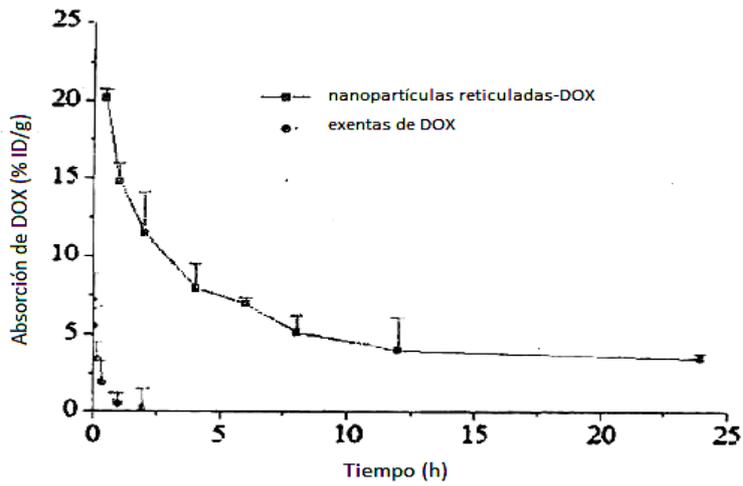


FIG 7

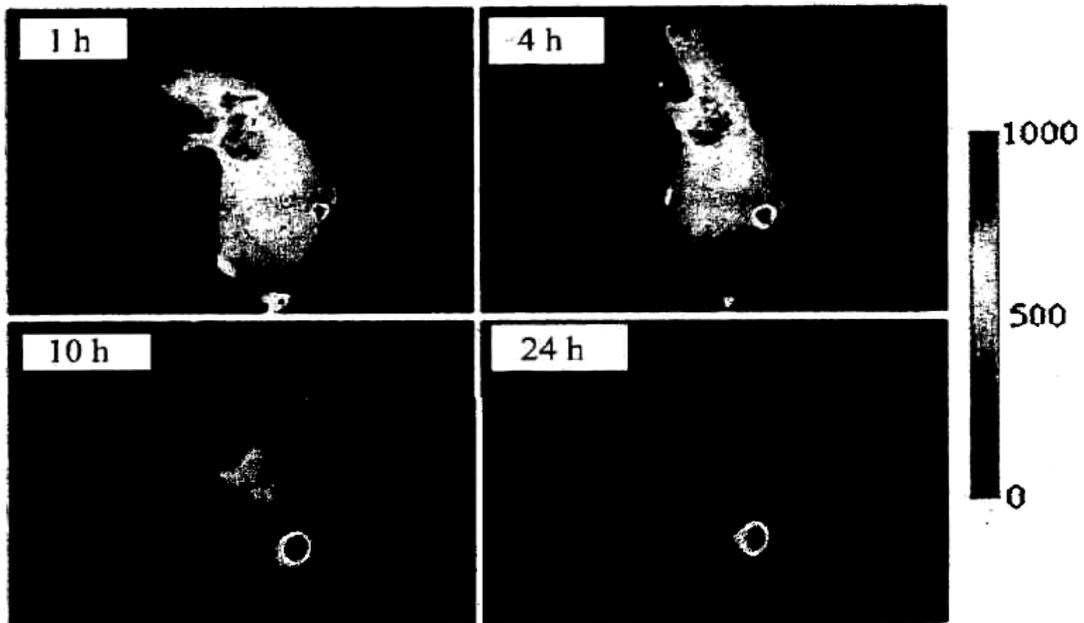


FIG 8

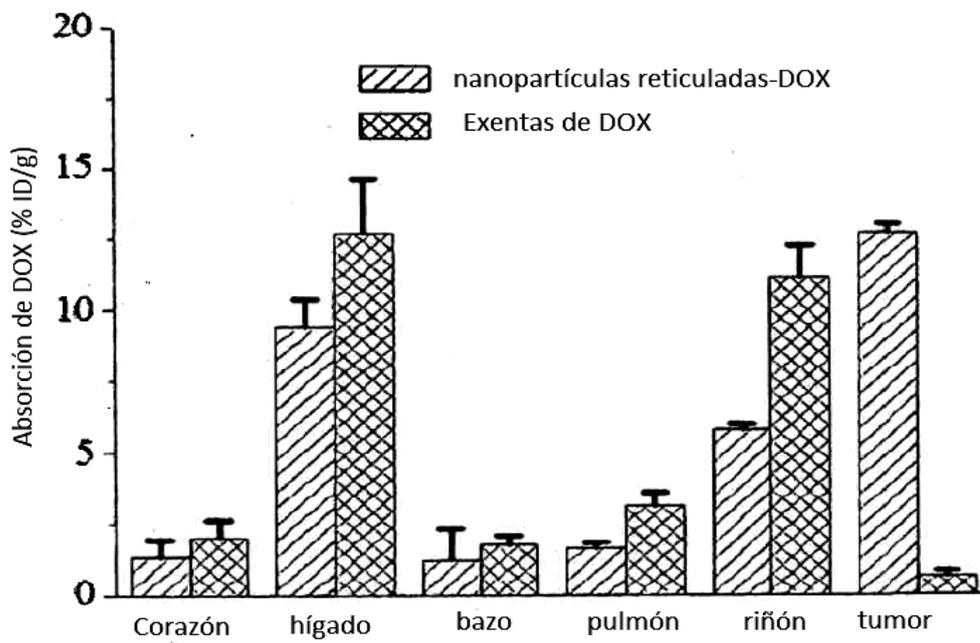


FIG 9

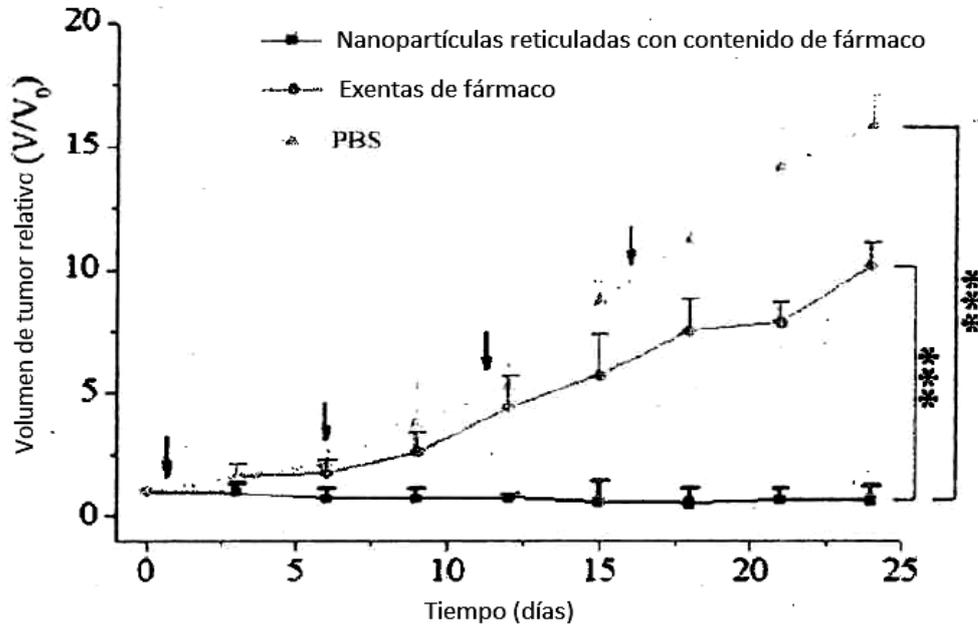


FIG 10

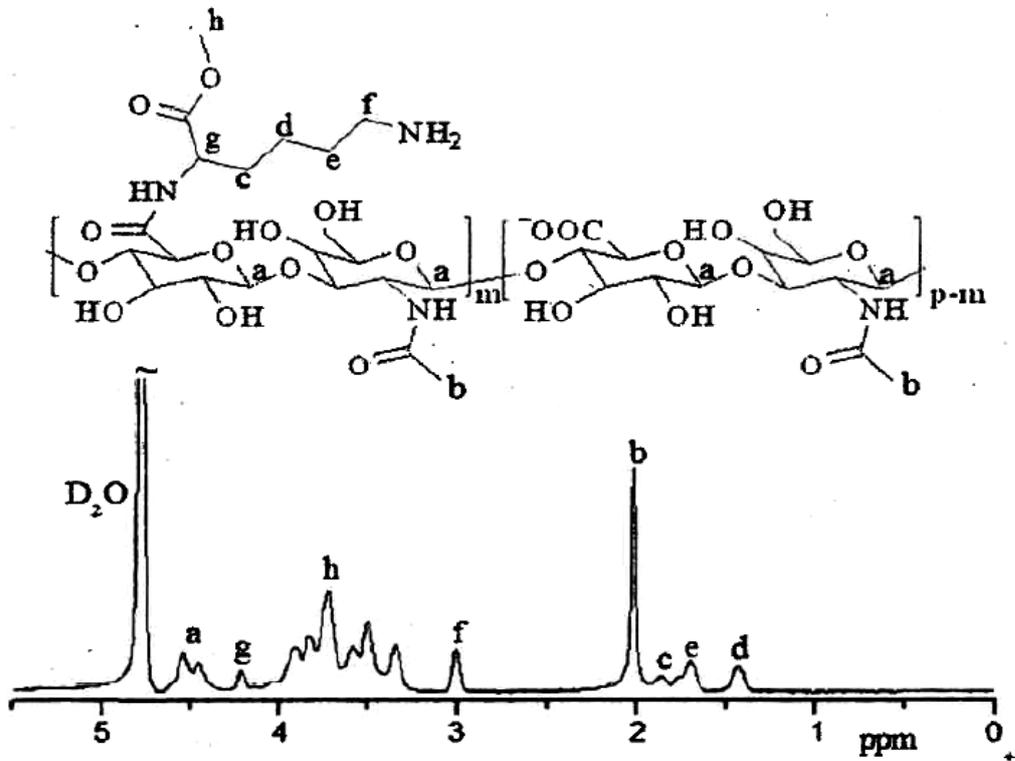


FIG. 11: Vías generales de preparación en Ejemplos 24 a 27

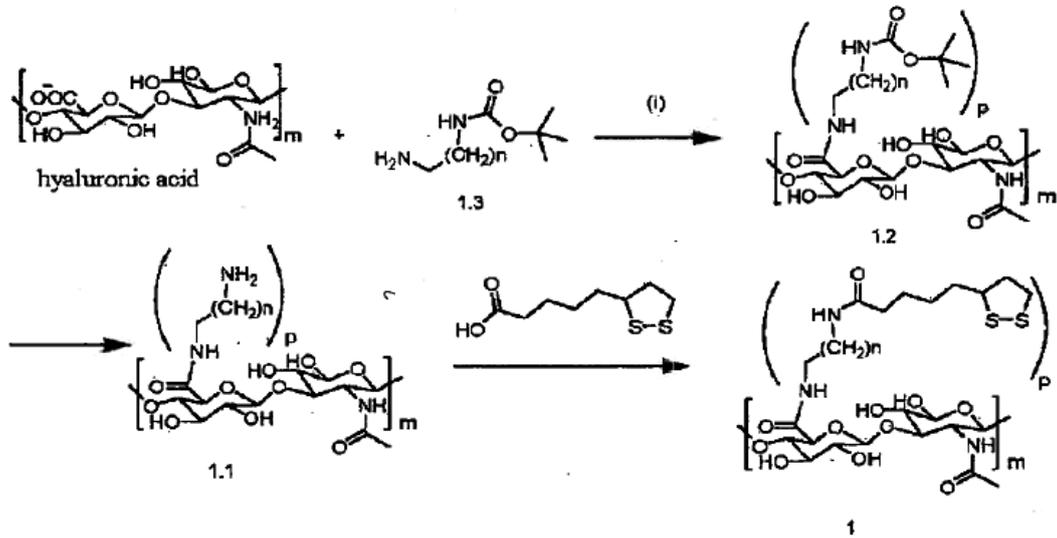
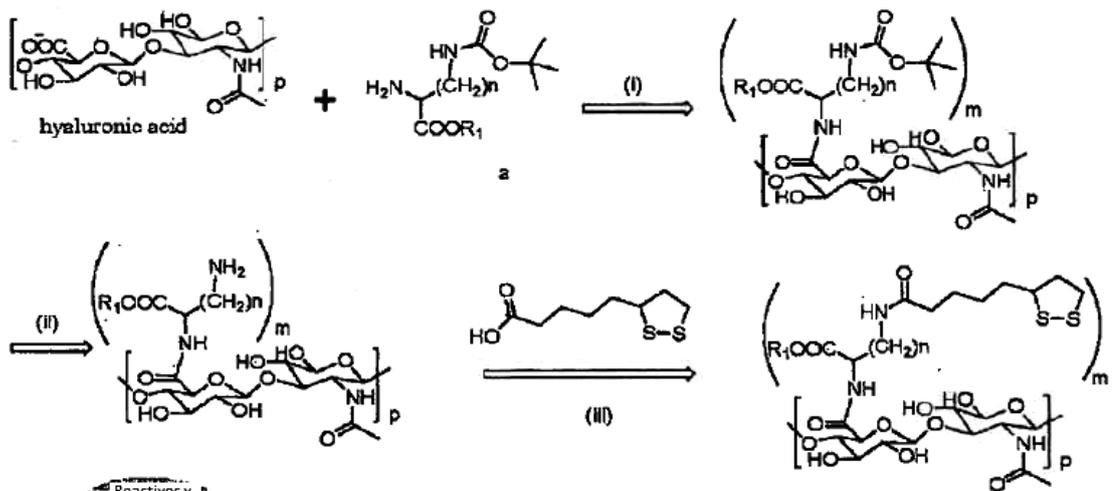


FIG. 12: Vías generales de preparación en Ejemplos 28 a 34



Reactivos y condiciones de reacción

(i) EDC/HNS, agua, 30°C, 24 h
 (ii) Ácido trifluoroacético/ácido clorhídrico, 30°C, 6h
 (iii) DCC/DMAP, N,N'-dimetilformamida/formamida, 30°C, 48 h

FIGs. 13A a 13D: resultados de cambios de crecimiento tumoral de nanopartículas reticuladas de HA-Orn-LA con contenido de DOX en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumores LP1 en el Ejemplo 60

Figs. 13A: gráfico que muestra un cambio de volumen tumoral relativo

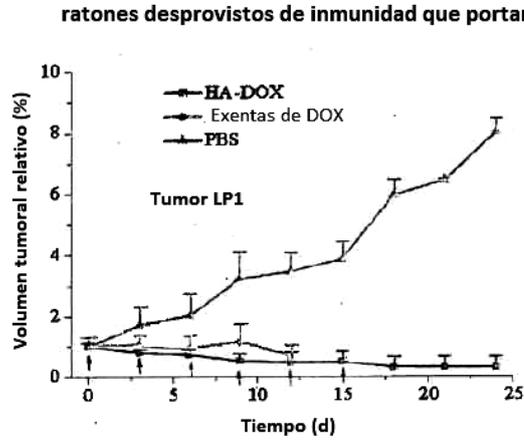


Fig. 13B: un gráfico que muestra un cambio de volumen tumoral relativo

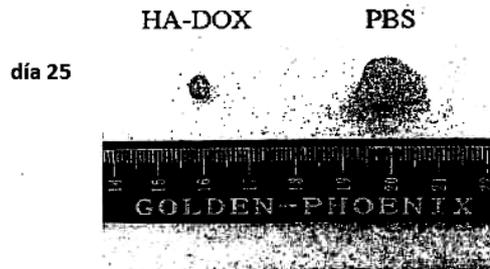


Fig. 13C: un gráfico que muestra un cambio de peso corporal relativo de ratones desprovistos de inmunidad

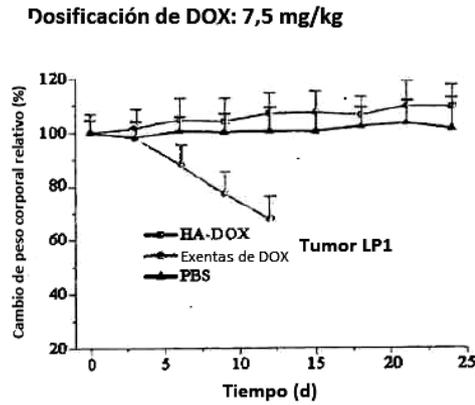


Fig: 13D: que muestra tasa de supervivencia de ratones

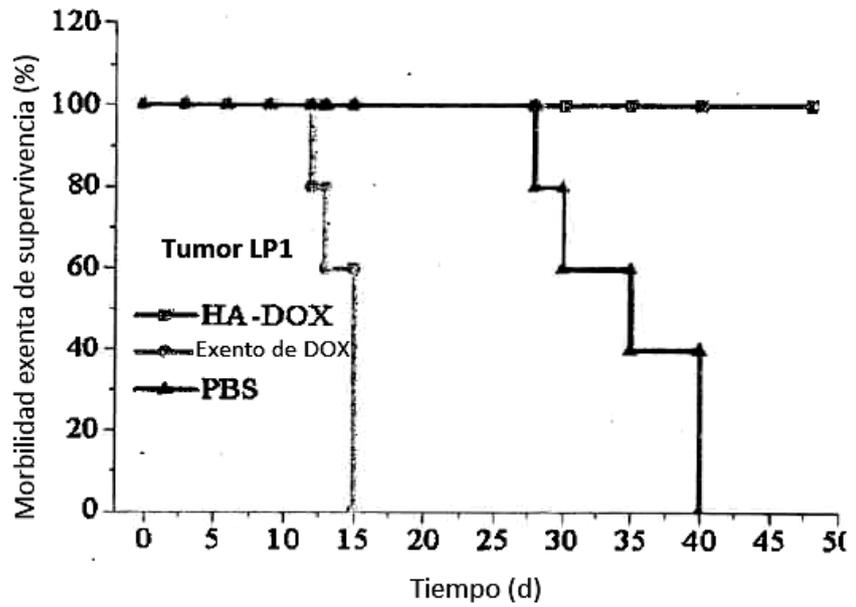


FIG 14: un gráfico que muestra resultados de circulación de nanopartículas reticuladas de HA-ornitina-LA con contenido de COX en ratones en el Ejemplo 61

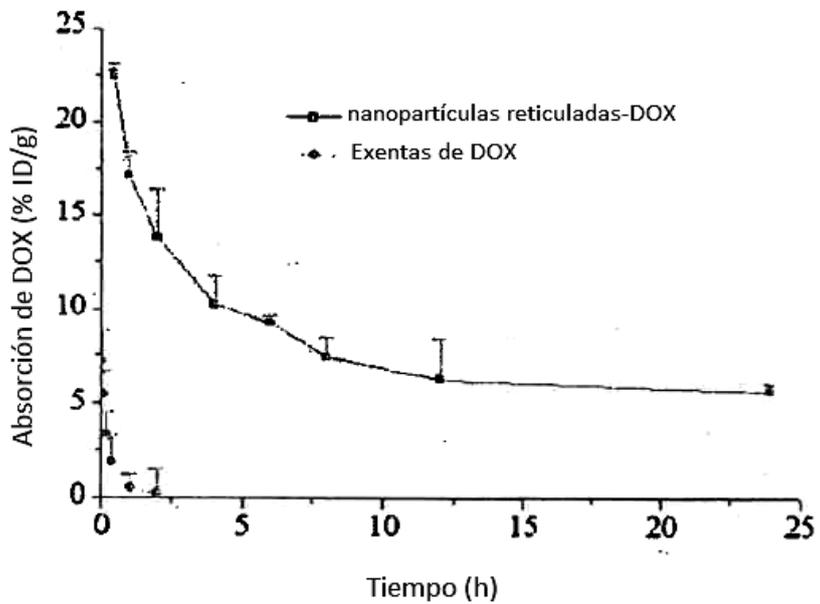


FIG. 15: un gráfico que muestra la bio-destrucción de nanopartículas reticuladas de HA-(aminohexilamino)-LA con contenido de DOX en ratones desprovistos de inmunidad que portan tumor MCF-7/ADR en el Ejemplo 62

